

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1960-1961

Série N°

THESE PRESENTEE A LA

FACULTE DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université (Pharmacie)

par

BRUYET PIERRE

*Pharmacien, ancien chef de laboratoire et ancien interne
des Hopitaux de Paris*

■

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
PHOSPHOMONOESTERASES PHAGOCYTAIRES**

■

Soutenue le

1961

devant la commission d'examen

Jury

Mademoiselle S. LAMBIN, *Président.*
Monsieur J. COURTOIS, *Professeur.*
Monsieur A. GERMAN, *Professeur.*

UNIVERSITE DE PARIS - FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1960-1961

Série N°

THESE PRESENTEE A LA

FACULTE DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITE DE PARIS

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université (Pharmacie)

par

BRUYET PIERRE

*Pharmacien, ancien chef de laboratoire et ancien interne
des Hopitaux de Paris*

■

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
PHOSPHOMONOESTERASES PHAGOCYTAIRES**

■

Soutenue le

devant la commission d'examen

Jury

Mademoiselle S. LAMBIN, *Président.*
Monsieur J. COURTOIS, *Professeur.*
Monsieur A. GERMAN, *Professeur.*



PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. G. VALETTE	- Doyen, 0		I
M-M. JANOT	- Assesseur		I
G. CUVIER	- Secrétaire Général		I
L. JEANDEL	- Secrétaire Général-Adjoint,		I
Mme S. CERTAIN	- Secrétaire		I
M.L. ESPINASSE	- Secrétaire		I

DOYEN HONORAIRE

M. René FABRE	- C		C, Membre de l'Institut
---------------	-----	--	-------------------------

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. René FABRE	- C		C, Membre de l'Institut	
DELEPINE	- C		I, Membre de l'Institut	
LAUNOY	- O		I, FLEURY O	I;
			MASCRE O	C
PICON	- O		I, BEDEL	

PROFESSEURS

MM. M-M. JANOT	-		I - Pharmacie Galénique (T.)
G. VALETTE	- O		I - Pharmacodynamie (T.)
R. PARIS	-		I - Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T.)

MM. M. GUILLOT	-		I - Physique (T.)
J. GAUTIER	-		I - Chimie organique (T.)
Mlle S. LAMBIN	-		I - Microbiologie (T.)
MM. Y. RAOUL	-		I - Zoologie appliquée (T.)
J. COURTOIS	-		I - Chimie biologique (T.)
L. DOMANGE	-		I - Chimie Minérale (T.)
P. CRETE	-		I - Botanique (T.)
R. TRUHAUT	- O		I - Toxicologie et Hygiène industrielle (T.)
A. MORETTE	-		I - Hydrologie (T.)
R. CAVIER	-		I - Parasitologie (T.)
A. QUEVAUVILLER			I - Hygiène (T.) et Education Sanitaire
R. MOREAU	-		I - Pharmacie chimique (T.)
J. GUY	-		I - Mathématiques appliquées aux sciences physiques et biologiques (T.P.)
A. GERMAN	-		I - Virologie et sérologie (T.P.)
M. PIETE	-		I - Biologie sanguine (T.P.)
P. MALANGEAU	-		A - Chimie Analytique (T.)
M. GIRARD	-		I - Chimie appliquée à l'expertise (T.)
G. DILLEMANN	-		- Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T.)
G. DEYSSON	-		I - Professeur sans chaire
J. FLAHAUT	-		Professeur sans chaire
A. LE HIR	-		Professeur sans chaire
J. RENAULT	-		A - Professeur sans chaire

MAITRES DE CONFERENCES

MM. P. LARUELLE	-		- Physique
G. LE MOAN	-		- Toxicologie
P. ROSSIGNOL	-		- Pharmacodynamie
H. RENAULT	-	 A	- Pharmacie chimique
G. PAOLETTI	-		- Radioisotopes - Applications à la Biologie et à la Pharmacie
A. MANGEOT	-	 A	- Chimie analytique
P. DELAVEAU	-		- Biologie végétale
C. BOUDENE	-		- Toxicologie et Hygiène industrielles
P. REYNAUD	-		- Sciences Physico-chimiques
A. DESVIGNES	-	 A	- Microbiologie
F. PERCHERON	-		- Biochimie
J.N. SAVEL	-		- Sciences Naturelles
N.	-		- Sciences Physico-chimiques
J. BORY	-		- Sciences Naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM. P. CORRIEZ	-	 I	- Physique
J. DUCHENNE	-		- Microbiologie
J. GARDENT	-		- Chimie analytique - 1ère année -
P. GESTEAU	-	  I	- Physique biologique
J. HARISPE	-	 I	- Chimie générale et pharmaceutiques
J. HENRY	-		- Chimie (4ème année)
M. LECLERC	-	 A	- Chimie biologique
M. LELUC	-		- Microbiologie

MM. M. LEMONNIER	-		- Chimie analytique (2è & 3è années)
Mle S. LONGUEVALLE	-	 I	- Service des examens de chimie
MM. P. PELLERIN	-		- Chimie analytique (2è & 3è années)
R. POTTIER	-	A	- Pharmacie galénique industrielle
P. POULLAIN	-		- Hématologie
M. ROBERT	-		- Sérologie
Mle A. ROLLEN	-	 	- Biologie végétale

INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

M. A. CAVE	-		- Chef de travaux de Pharmacotechnie galénique
Mle H. MORIN	-	 A	- Chef de travaux de pharmacodynamie
M. ROBBA	-		- Chef de travaux de Pharmacotechnie chimique

BIBLIOTHEQUE

Mle Y. RUYSSSEN	-	  I	- Conservateur, chargé de la Direction
Mle LAVAUD	-	 I	- Conservateur
MMes DESGRIPPES	-	 A	- Bibliothécaire
KREHMER	-	 A	- Bibliothécaire

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES
PHOSPHOMONOESTERASES PHAGOCYTAIRES**





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Je dédie cette thèse,

A la mémoire de ma Mère,

dont je garde si profondément le souvenir; son dévouement,
sa tendresse, m'ont appris ce qu'est le bonheur

A mon Père,

qui a su me montrer ce que peuvent la volonté et le goût du
travail;

Hommage de ma piété filiale et de ma profonde
reconnaissance.

A ma Femme,

En signe de gratitude pour l'aide qu'elle m'a apportée pen-
dant mes années de stage hospitalier;

A nos Filles Françoise et Annie,

En témoignage d'une passion scientifique que j'aimerais
leur voir partager;

Avec toute mon affection.

A tous les Miens.

A tous mes Amis.

A mon Jury de Thèse.

- A Mademoiselle S. LAMBIN

Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris

Après avoir suivi avec patience et sympathie la préparation de cette thèse, elle veut bien aujourd'hui en présider le jury.

- A Monsieur J. COURTOIS,

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris. Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris.

De lui, j'ai reçu de bienveillants conseils et bénéficié de remarques pertinentes.

- A Monsieur A. GERMAN,

Professeur de Virologie et Sérologie à la Faculté de Pharmacie de Paris. Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris.

Maintes fois, il m'a témoigné une amitié dont je sens tout le prix

En respectueuse et profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur A. DELAUNAY

Chef du Service de Pathologie expérimentale,

(Institut Pasteur, Garches (S-&-O))

Il m'a donné le sujet de cette thèse,

J'ai trouvé en lui : Un Maître

Un exemple

et l'Ami le plus sûr.

En témoignage de ma reconnaissance infinie et d'une affection
à l'image de la sienne.

A Mademoiselle S. BAZIN,

Docteur ès Sciences; Docteur en Pharmacie,

Chargée de recherches au C.N.R.S.

Elle me connaît depuis le début de mes études pharmaceutiques.

J'ai toujours trouvé près d'elle, avec la bienveillance d'une Amie,

l'appui d'un grand savoir.

Avec mon très respectueux et très vif attachement.

A Monsieur H. BAZIN

Ancien chef de travaux pratiques à la Faculté de Pharmacie
de Nancy,

Mon premier Maître dans la profession, il m'en a fait comprendre la grandeur.

A Monsieur P. CHERAMY,

Pharmacien Chef des Hôpitaux de Paris,

dont je fus l'élève puis le collaborateur à l'Hôpital St Louis.

A tous ceux qui ont été mes Maîtres, au Lycée,
à la Faculté de pharmacie,
dans les Hôpitaux de Paris

A tous Ceux qui m'ont aidé :

En particulier

A Madame Christiane MEIGNIEN-GAUTHIER,

qui, pour ce travail, fut une collaboratrice de tous les jours.
Elle s'y est consacrée avec une foi et une confiance absolues,
avec un dévouement inlassable, ce que je n'oublierai jamais.

A Mesdames M. HENON
J. LEBRUN-PAGES
M. PELLETIER

A Messieurs O. BAILLY
P. GRUBIUS
R. MESLE
E. URAGA

Ils m'ont apporté, les uns et les autres,
une aide matérielle et de précieux avis.

P L A N

INTRODUCTION G E N E R A L E

- Court rappel historique. '
- Définition des phosphatases par leur substrat. '
- Place des phosphomonoestérases (PME) parmi les phosphatases.
- Rappel des notions concernant la caractérisation des phosphatases. '
- Définition des phosphomonoestérases. '
- Présence des PME dans les leucocytes :
historique de leur mise en évidence. '
- Notre but : étudier les PME des cellules inflammatoires. '
- Définition des cellules inflammatoires :
les polynucléaires, les macrophages. '
- Plan de notre travail. '
- Remerciements. '

PREMIERE PARTIE

Etat actuel de la question

INTRODUCTION

CHAPITRE I : TECHNIQUES UTILISEES

A - Les techniques histochimiques.

1 - Techniques de GOMORI.

2 - Problème de la préparation et de la fixation des tissus.

3 - Problème du choix des substrats.

a - Phosphatases spécifiques.

b - Sensibilisation des techniques.

- Techniques de GOMORI (aux glycérophosphates) modifiées.

- Choix d'autres substrats :

 - .. Dérivés du naphтол.

 - .. Phénylphosphate.

 - .. Autres techniques, utilisant des corps radioactifs.

c - Y a-t-il identité des résultats selon les substrats utilisés ?

B - Les techniques biochimiques.

1 - Mode d'obtention des leucocytes.

- a - A partir du sang circulant.

- b - A partir d'exsudats péritonéaux.

2 - Mode d'obtention des macrophages.

3 - Libération des enzymes.

4 - Substrats.

5 - pH et solutions tampons.

CHAPITRE II : RESULTATS OBTENUS

A - PME des leucocytes.

- 1 - *Leucocytes normaux.*
- 2 - *Leucocytes anormaux.*
- 3 - *Cellules souches.*
- 4 - *Leucocytes normaux au cours d'états pathologiques.*
- 5 - *Localisation intracellulaire des PME*
- 6 - *Cas particulier des polynucléaires inflammatoires.*
- 7 - *Phagocytose.*
- 8 - *Action du froid.*
- 9 - *Influence d'effecteurs variés.*

B - PME des macrophages.

DEUXIEME PARTIE

Recherches personnelles

CHAPITRE I : PRESENTATION GENERALE

A - Les cellules choisies.

- 1 - Les polynucléaires.
- 2 - Les macrophages.

B - Les problèmes étudiés.

- 1 - Détermination des pH optimum des diverses PME.
- 2 - Mise en évidence du rôle de certains effecteurs.
- 3 - Influence de certains facteurs biologiques.
- 4 - Le processus de la phagocytose.

C - Les techniques utilisées.

CHAPITRE II : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'ETUDE

A - Principes généraux de la technique utilisée.

B - Réaction enzymatique.

- 1 - Le matériel.
 - a - Le bain-marie.
 - b - La verrerie.

2 - *Facteurs physiques qui interviennent dans la réaction.*

a - pH optimum d'action.

b - La température.

c - Durée de l'expérience.

3 - *Le substrat.*

4 - *Les solutions tampons.*

a - Essais préliminaires.

b - Tampons alcalins.

c - Tampons acides.

5 - *Le liquide de suspension.*

6 - *Détermination de la richesse en cellules.*

7 - *Importance de la richesse du milieu en leucocytes.*

C - Dosage du phosphore minéral libéré.

1 - *Technique de BRIGGS.*

2 - *Justification de cette technique.*

D - Expression des résultats.

E - Résumé de la technique.

CHAPITRE III : APPLICATION DE NOTRE TECHNIQUE A L'ETUDE DES POLYNUCLEAIRES INFLAMMATOIRES

A - Préparation des polynucléaires.

1 - *Les leucocytes utilisés.*

2 - *Caractère des exsudats.*

3 - *Préparation de la suspension cellulaire.*

4 - *Justification de ce procédé opératoire.*

B - Détermination des pH optimum.

1 - Zone alcaline.

2 - Zone acide.

C - Richesse en PME des leucocytes inflammatoires provenant d'animaux normaux.

D - Contribution à l'étude des caractères de ces PME.

1 - Etude de l'action de divers effecteurs chimiques.

a - Action des phosphates.

b - Etude de l'influence du Magnésium sur la PME alcaline.

c - Effet d'un sel de zinc sur la PME alcaline.

d - Effet de l'acide borique sur la PME alcaline.

e - Effet du Magnésium, du zinc et de l'acide borique, sur la PME acide.

2 - Etude d'un effecteur physique : le froid.

E - Contribution à l'étude de l'influence de certains facteurs biologiques.

Introduction

1 - Influence d'extraits leucocytaires ou d'extraits de rate.

2 - Influence de l'avitaminose C.

F - Contribution à l'étude de l'influence de la phagocytose.

Introduction

1 - Essai préliminaire avec des leucocytes inflammatoires.

*2 - PME et phagocytose par des polynucléaires inflammatoires.
Etude statistique du phénomène.*

3 - Addendum.

CHAPITRE IV : RESULTATS OBTENUS AVEC LES MACROPHAGES

Introduction

A - Préparation des macrophages.

B - Détermination des pH optimum.

1 - Premiers travaux.

2 - Discussion.

a - Influence de l'huile de paraffine.

b - Recherche de la présence d'un inhibiteur naturel de la PME alcaline.

c - Recherche d'une PME alcaline de faible activité. '

C - Sur quelques caractères de la PME acide.

1 - Influence des phosphates.

2 - Etude de l'action de divers effecteurs. .

CONCLUSIONS

INTRODUCTION GENERALE

L'existence, dans les tissus animaux, d'enzymes qui libèrent des ions phosphoriques à partir de divers substrats naturels ou artificiels est connue depuis longtemps. Aux enzymes, ainsi définies, a été donné le nom de *phosphatases*.

Dès 1908, E.V. Mac COLLUM et E.B. HART (71) reprenant les travaux de V. SUZUKI, K. YOSHIMURA et M. TAKAISHI (1907) (103) montraient que des extraits de foie et de sang de boeuf possèdent le pouvoir de libérer de l'acide phosphorique, à partir de la phytine.

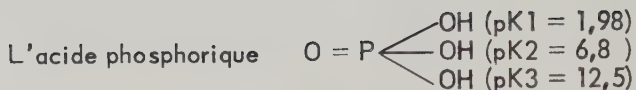
De nombreux travaux furent ensuite consacrés aux phosphatases ainsi mises en évidence. Parallèlement, divers auteurs montrèrent la participation de dérivés phosphorylés à divers métabolismes cellulaires : esters hexosephosphoriques dans le métabolisme glucidique (Harden et Young; Neuberg); dérivés phosphoriques dans la glycolyse et la glycogénolyse au niveau du tissu musculaire (Embden; Parnas; Meyerhof) et dans la formation du tissu osseux (Robinson) (24). Ce dernier auteur montra l'existence de phosphatases très actives dans le tissu osseux jeune et voulut faire jouer un rôle à ces enzymes dans l'ossification. Le rôle des phosphatases, dans la vie animale, semble donc être particulièrement important. Il reste cependant fort mal connu. Un fait est certain : les phosphatases sont très répandues dans la nature. Par ailleurs, il est *incontestable* que des phosphatases variées coexistent au sein d'un même milieu; il s'agit donc de mélanges d'enzymes différentes par leurs substrats préférentiels, par leurs pH optimum d'action. Certaines enzymes ont un spectre d'activité large, intéressant une famille chimique; d'autres, au contraire, ont une spécificité élective telle que, seul, un corps chimique bien déterminé est hydrolysable par l'enzyme.

Deux conclusions à ces remarques :

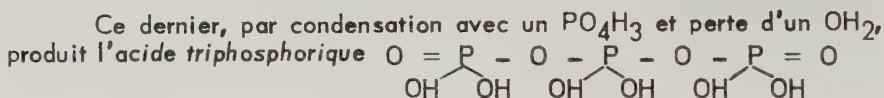
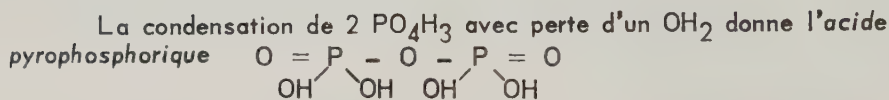
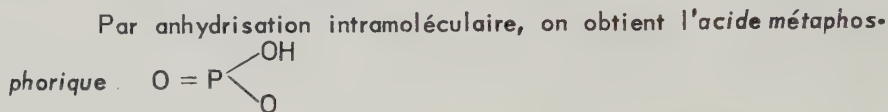
- 1 - L'étude d'une activité enzymatique d'un tissu donné, n'est, en réalité, que celle de la résultante d'enzymes diverses;
- 2 - Il est difficile de caractériser et de classer les enzymes.

La dénomination (et la caractérisation) des phosphatases se fondent, en premier lieu, sur les substrats sensibles à l'action de ces enzymes.

La libération d'ions P_2O_5 par les humeurs ou les tissus peut se faire par hydrolyse enzymatique de nombreux corps. Rappelons donc, en quelques mots, ce que sont les acides dérivés du phosphore et rencontrés dans la nature.



possède 3 oxydrides qui ne sont pas identiques, le premier se conduisant comme un acide fort.



Chacun de ces acides donne naissance à des esters naturels susceptibles d'être des substrats d'enzymes.

Les *ESTERS DE L'ACIDE PHOSPHORIQUE* sont de trois types, suivant que 1, 2 ou 3 fonctions de l'acide sont saturées. On les appelle : mono, di ou triesters.

Quels sont les corps naturels connus appartenant à ce groupe et pouvant servir de substrat à des phosphatases ?

On ne connaît pas de phosphatases actives sur des *triesters*. Ceux-ci toutefois ont la particularité d'être labiles en présence d'acide ou de base dilués ou même dans l'eau à 88°.

Les *diesters phosphoriques* sont en général hydrolysés par des enzymes spécialisées. Parmi les diesters naturels, citons : les *acides phosphatidiques* qui dérivent des *céphalines* et des *lécithines*.

Les *monoesters orthophosphoriques* sont très répandus. Citons les *glycérophosphates*, les *hexoses monophosphates*, les *hexoses-di-phosphates*, les *nucléotides*, les *phytates*. Ces corps peuvent subir l'action d'enzymes très spécialisées (ex : les *nucléotidases*) ou d'enzymes à large spectre, actives sur tout le groupe des monoesters, qu'on appelle des *phosphomonoesterases*.

Les esters *pyrophosphoriques* résultent de la combinaison d'une fonction acide de l'acide pyrophosphorique avec une ou plusieurs fonctions alcool ou phénol de dérivés organiques ; parmi eux, citons : l'acide *adénylpyrophosphorique*.

Aux esters *triphosphoriques*, appartiennent ceux de l'acide *adénosine-triphosphorique*.

Citons enfin les phosphocréatinine et phosphoarginine, du groupe des *amides orthophosphoriques* qui sont des substrats de phosphatases spéciales. '.

Outre la caractérisation par le substrat, les phosphatases, comme toutes les enzymes, se déterminent aussi par le *pH optimum* de leur action. '.

En effet, un matériel ayant *spécifiquement* une activité phosphatase donnée, doit parfois cette activité à un groupe de phosphatases spécifiques d'un substrat mais de caractéristiques variées. 'Ces phosphatases sont dites "*isodynames*". Le *pH optimum* d'activité est le plus constant des caractères propres à chaque enzyme. '.

Enfin la détermination qualitative et quantitative de l'action d'effecteurs variés (activateurs ou inhibiteurs), ainsi que celle des concentrations de substrats sur les vitesses d'action des enzymes (Constante de Michaelis), ajoutent à la caractérisation des enzymes, ce qui peut permettre l'identification d'enzymes isodynames d'origines diverses. 'La chromatographie permet aussi de séparer certaines enzymes isodynames mais d'origines tissulaires différentes. '.

Parmi les phosphatases, les *PHOSPHOMONOESTERASES* (ou PME) sont celles qui ont été le plus et le mieux étudiées. Leur groupe est particulièrement riche en individualités. Elles ont toutes pour substrat de prédilection les monoesters de l'acide phosphorique. L'étude des PME, non spécifiques d'un phosphomonoester donné, se fait par l'observation de leur action sur les glycérophosphates, les phénylphosphates ou d'autres sels analogues. '.

C'est en mettant en présence une solution de glycérophosphate de sodium et une suspension de leucocytes inflammatoires que M. D. KAY en 1929 révèle l'existence de PME dans les leucocytes (61). En 1931 J. ROCHE étudie ces enzymes en présence de β glycérophosphate de sodium à divers pH. Il démontre une similitude entre la PME du sérum et celle des leucocytes (pH commun = 8,8 à 9,2) et une différence entre ces PME et celles des hématies (pH optimum = 7,0). Il met donc en évidence une phosphomonoestérase *alcaline*, les leucocytes utilisés étant des mélanges de *granulocytes* et d'*agranulocytes*, préparés à partir de sang de lapin, cobaye et cheval (92, 93). '.

En 1931, M. UMENO effectue le même travail mais avec des leucocytes provenant d'exsudats péritonéaux préparés selon la technique de J. de HAAN (50). Son exposé ne mentionne pas le pH du milieu d'incubation, ni la nature des cellules en expérience (110).

En 1936, N. FIESSINGER et F. BOYER (35) utilisent la technique classique de dosage de la phosphomonoestérase alcaline sérique due à BODANSKY et PAUTRAT et l'appliquent à une suspension de leucocytes retirés, soit d'un sang de leucémie lymphoïde, soit d'exsudats péritonéaux, soit de collections suppurées. Ils notent que les leucocytes

ne sont doués que d'une action PME minime. Ils estiment que les leucocytes ne sont pas à l'origine de l'activité PME du sérum sanguin car ils n'ont pu augmenter l'activité PME d'un sérum sanguin donné, en lui ajoutant des leucocytes retirés d'un pus ou d'un autre sang. Ils affirment, par contre, que l'activité phosphatasique des leucocytes ne serait due qu'au sérum sanguin adsorbé à la surface des cellules.

En 1939, G. GOMORI (42) remet tout en cause. C'est à cet auteur que l'on doit la première technique de mise en évidence, par procédés histochimiques, des phosphatases tissulaires. L'existence de ces enzymes dans les leucocytes n'est plus, à partir de ce moment, discutée. Une ère nouvelle commençait, qui allait connaître de nombreux travaux sur les PME leucocytaires. Nous aurons à revenir plus loin sur certains d'entre eux.

C'est le Docteur A. DELAUNAY, chef du service de pathologie expérimentale de l'Institut Pasteur de Garches, qui attira notre attention sur ces enzymes. Dans son laboratoire, l'étude de la réaction inflammatoire sous tous ses aspects est constamment poursuivie depuis plus de vingt ans. Lorsqu'il nous confia ce travail, le Docteur DELAUNAY faisait une étude comparée, avec Mademoiselle S. BAZIN, de la teneur en glycogène des polynucléaires inflammatoires et des polynucléaires du sang circulant.

D'autres auteurs : H.B. FELL et J.F. DANIELLI (34), M. WACHSTEIN (124), S. UTSUNOMIYA et K. YOSHIMURA (111), venaient de démontrer, par histochimie, que les leucocytes se trouvant au niveau de plaies, de brûlures, de fractures (donc des leucocytes inflammatoires) sont particulièrement riches en phosphomonoestérases alcalines.

Dans ces deux groupes de travaux, les cellules utilisées étaient des phagocytes. Il semblait donc intéressant, en rapprochant les faits, d'étudier les PME au niveau des divers types de phagocytes rencontrés dans les exsudats péritonéaux.

Si l'on injecte du bouillon stérile dans la séreuse péritonéale de cobayes, on constate, dans les heures qui suivent, l'apparition d'une réaction péritonéale intense. Si l'on ponctionne cet exsudat, on recueille un liquide, stérile, jaunâtre, trouble, qui contient en suspension de nombreuses cellules, dont 95 % au moins appartiennent au type *polynucléaire*. Ces cellules proviennent du sang circulant; elles ont passé la barrière vasculaire par diapédèse. Elles avaient pris naissance dans la moelle osseuse épiphysaire de quelques os : vertèbres, sternum, côtes. Si aucun fait nouveau n'intervient, l'exsudat péritonéal tend à se résorber et, en 24 heures, tout rentre dans l'ordre.

Les *polynucléaires*, premier type de phagocytes rencontré chez les mammifères, disparaissent avec le liquide d'exsudat.

Par contre, si l'on injecte un corps stérile mais non résorbable, comme l'huile de paraffine, la même réaction apparaît dans les mêmes

délais. Mais, après 24 heures, la résorption ne se produit pas, et, quatre jours après l'injection, on peut, par ponction, retirer un liquide très trouble contenant en suspension des gouttelettes d'huile ainsi que des cellules d'un type particulier ayant phagocyté de l'huile. Que sont ces cellules ?

Elles appartiennent au deuxième type de phagocytes.

Dans ce groupe on rencontre, d'une part : des éléments du système réticulo-endothélial, d'autre part : des macrophages. Parmi les premiers, on distingue des cellules fixes qui étaient primitivement postées en embuscade le long des sinusoides sanguins et lymphatiques, et des cellules libres, mobilisables, d'abord réparties dans le tissu conjonctif. Parmi les cellules libres, on peut mettre en évidence des cellules particulières, fusiformes, arborisées, appelées "histiocytes", qui, dans certaines conditions, sont mobilisées par l'organisme et se transforment alors en cellules particulières : les *MACROPHAGES*. Ce type de phagocyte correspond donc plutôt à un état particulier que revêtent certaines cellules différenciées. Outre les histiocytes, d'autres cellules peuvent être l'objet de telles modifications. Citons : les fibroblastes, certaines cellules épithéliales ou musculaires et surtout les monocytes du sang. Dans certaines conditions, les monocytes, comme les polynucléaires, quittent le courant sanguin et prennent l'aspect de macrophages typiques.

Les macrophages, indépendamment de leur origine, ont tous le même aspect. Ce sont des cellules de grande taille ($75\ \mu$ environ), globuleuses, formées d'un corps central ou "trophoplasme" qui contient le noyau et d'une zone marginale ou "kinoplasme". Les macrophages sont des cellules mobiles, douées de sensibilité chimiotactique et qui possèdent un fort pouvoir phagocytaire.

La réaction péritonéale du type macrophagique finit aussi par s'éteindre. Les macrophages diminuent en nombre puis disparaissent.

C'est à ces deux types de cellules : *polynucléaires inflammatoires* et *macrophages* qu'ont été consacrés les essais rapportés dans ce travail.

Nos premiers dosages ont été pratiqués selon une technique directement inspirée de celle de *BODANSKY* pour les dosages des PME alcalines dans le sérum sanguin (10).

Depuis de nombreuses années, nous pratiquons ces dosages pour le Service de Rhumatologie de l'hôpital Saint-Louis, dirigé par le Docteur *WEISSENBACH*, d'abord comme interne en pharmacie du service, puis comme chargé du Service de Chimie biologique. Nous entreprîmes alors une bibliographie sur un sujet proposé par le Docteur *DELAUNAY* et Mademoiselle *BAZIN* : Les phosphomonoestérases des phagocytes.

Cette bibliographie a été poursuivie pendant toute la durée des essais rapportés ici. Nous rappellerons, dans la première partie de notre exposé, le résultat de ces analyses bibliographiques. Tout d'abord

nous évoquerons les techniques histochimiques, puis les techniques biochimiques, révélant l'existence des PME tissulaires. Puis nous rapporterons les résultats des nombreux auteurs qui ont étudié particulièrement le cas des leucocytes. Lorsque les deux types de techniques auront été utilisés, nous comparerons les résultats.

En fonction, d'une part, des conclusions de l'enquête bibliographique effectuée, d'autre part, des recherches que nous entendions poursuivre, nous chercherons à dégager pourquoi fut choisie la technique finalement utilisée par nous.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous ferons une mise au point de cette technique et nous dirons comment nous l'avons adaptée au problème particulier des cellules inflammatoires.

Enfin, nous passerons en revue les résultats de nos recherches sur les phosphomonoestérases des polynucléaires et des macrophages.

Notre travail fut d'abord effectué à la fois dans le laboratoire de Pathologie expérimentale de l'Institut Pasteur de Garches (où était réalisée l'expérimentation animale) et dans le laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital Saint-Louis (où étaient faites les déterminations des activités phosphatasiques). Il fut terminé entièrement à l'Institut Pasteur de Garches.

Au Docteur DELAUNAY, chef du Service de Pathologie expérimentale de l'Institut Pasteur, nous voudrions exprimer ici toute la reconnaissance que nous lui témoignons et que les mots sauront certainement mal traduire. Il nous a donné l'idée de ce travail et, pendant les années où se sont poursuivies nos recherches, avec des vicissitudes multiples et diverses, il n'a jamais cessé de suivre nos efforts et de nous prodiguer, avec les conseils que lui dictait sa parfaite connaissance de la réaction inflammatoire, des encouragements souvent fort utiles. Il nous a ainsi donné, non seulement un sujet d'étude, mais encore une foi en la recherche qui nous semble être la seule manière de rendre hommage à l'enseignement que nous avons reçu de tous nos Maîtres et Professeurs. Il a bien voulu faire, aussi, de nous son Ami : Qu'il sache combien nous en sommes fiers et aussi combien nous sommes conscients de ce que représente pour nous cette amitié.

Nos remerciements iront également à Mademoiselle BAZIN, chargée de recherches au CNRS, inspiratrice, comme le Docteur DELAUNAY, de ce travail. Après avoir été un précieux et amical guide lors de notre stage en pharmacie chez Monsieur H. BAZIN, son père, elle a bien voulu nous prodiguer ses conseils chaque fois que nous avons fait appel à ses grandes connaissances, acquises au cours de longues et belles années de recherches. Nous tenons à l'assurer de notre reconnaissance et de notre respectueux attachement. Que M. H. BAZIN, ancien chef de travaux pratiques à la Faculté de Pharmacie de Nancy, notre premier maître dans la profession, sache que nous éprouvons, à son égard, les mêmes sentiments : il sut nous montrer la richesse, la variété, l'importance de l'enseignement reçu dans cette profession et la valeur d'un travail acharné.

Monsieur P. CHERAMY, pharmacien chef de l'Hôpital Saint-Louis a bien voulu nous accueillir dans son service comme interne, puis nous confier la direction du laboratoire attaché à son officine. Il nous a toujours témoigné le plus grand intérêt, la plus parfaite et confiante compréhension. Il a suivi le début de ce travail et nous a, maintes fois, conseillé pour résoudre certains problèmes techniques. Nous sommes heureux de lui exprimer ici notre respectueuse et fidèle reconnaissance.

Mademoiselle LAMBIN, Professeur de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie de Paris, a bien voulu nous suivre dans ce travail, puis nous faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'elle soit assurée, ici, de notre grande reconnaissance et de notre profond respect.

Monsieur COURTOIS, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Pharmacie de Paris, pharmacien chef des Hôpitaux de Paris, a bien voulu nous recevoir, avec le Docteur DELAUNAY, au début de ce travail et nous apporter de précieux enseignements sur le délicat problème posé par les phosphatases qu'il étudia avec tant de soin. Nous tenons à le remercier très vivement de la parfaite et amicale sympathie qu'il nous a toujours témoignée. Qu'il sache combien nous lui sommes reconnaissant de bien vouloir être du jury de cette thèse avec laquelle nous espérons ne point trop le décevoir.

Que Monsieur GERMAN, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris, pharmacien chef des Hôpitaux de Paris, veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

Nous voudrions enfin exprimer toute notre reconnaissance à Madame Ch. MEIGNIEN-GAUTHIER, technicienne si dévouée, qui nous apporta, lors de ces recherches, son concours d'une manière constante et parfaite. Elle permit la continuité de ce travail que nos obligations professionnelles ne permettaient pas toujours d'assurer. Qu'elle trouve ici l'assurance de notre très fidèle et très amicale gratitude.

★

★ ★

PREMIERE PARTIE

Le premier problème qui nous était posé comportait la mise au point d'une technique d'étude. Or, la littérature consacrée aux phosphatases nous montre que deux grands types de techniques ont été employés : D'une part les techniques biochimiques, utilisées par les premiers auteurs (M. D. KAY, J. ROCHE, M. UMENO, N. FIESSINGER et F. BOYER), d'autre part, les techniques histochimiques dont G. GOMORI fut le promoteur.

Nous étudierons séparément ces deux groupes de modes opératoires. Nous nous efforcerons de mettre en évidence ce qui fut l'apport de chaque auteur et les raisons des modifications apportées aux méthodes antérieures.

Enfin, nous comparerons les résultats fournis par les diverses publications consacrées aux phosphomonoestérases leucocytaires.

CHAPITRE I

A - LES TECHNIQUES HISTOCHIMIQUES

Dans les premiers travaux consacrés aux phosphatases des leucocytes, les auteurs utilisèrent des techniques biochimiques directement inspirées des méthodes classiques de dosages des phosphatases sériques, mais c'est à G. GOMORI qu'est dû le grand essor de l'enzymologie cellulaire. Les procédés proposés par cet auteur relevant de l'histochemie, nous commencerons donc par les techniques histochemiques.

1 - TECHNIQUES DE GOMORI

C'est en 1939 que G. GOMORI propose une première technique pour mettre en évidence les PME alcalines dans les tissus animaux et végétaux (42). Il la précise en 1941 (44).

Le principe général en est le suivant : La coupe histologique du tissu, après fixation, est mise en présence d'une solution tamponnée, au pH désiré, de β glycérophosphate de sodium, solution qui contient en outre du nitrate de calcium. La coupe est ensuite mise dans une solution de nitrate de cobalt (il y a formation, in situ, de phosphate de cobalt) puis dans une solution de sulfure de sodium (le phosphate de cobalt cède la place à du sulfure de cobalt, noir). Ainsi la présence de la PME est révélée par l'apparition d'un précipité noir. Mais cette technique n'est valable que pour les pH alcalins. En effet, en milieu acide, le phosphate de calcium, soluble, disparaît de la coupe. Aussi préfère-t-on, pour les PME acides, la technique spéciale de G. GOMORI reprise par M. RABINOVITCH (89). Le substrat est formé par une solution de β glycérophosphate de sodium et de nitrate de plomb. Le phosphate de sodium, dès sa formation, se transforme en phosphate de plomb, qui est ensuite mis en évidence par une solution de sulfure d'ammonium, formant un précipité brun noir de sulfure de plomb.

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude critique de ces techniques. De longs exposés les résumant sont dûs à L. LISON (69) et à J. VERNE (122). L'histochemie doit permettre de mettre en évidence la topographie des zones tissulaires où siègent des phosphatases et pour chaque cellule elle doit assurer la visualisation (Verne) des parties positives de la cellule. Les auteurs s'appliquent, en général, à éviter la disparition des enzymes lors de diverses manipulations et à empêcher la diffusion intracellulaire des sels formés. D'où la multiplicité des publications modifiant les techniques de base. Les modifications intéressent la fixation des tissus, les substrats, la révélation des catabolites

du substrat, le minutage des différents temps opératoires, l'élimination ou le contrôle des réactions parasites. Autant de problèmes que nous évoquerons maintenant.

2 - PROBLEME DE LA PREPARATION ET DE LA FIXATION DES TISSUS

N'y a-t-il pas inhibition ou élimination de la phosphatase au cours des opérations de coupe et de fixation ?

L'inclusion, dans la paraffine, des pièces anatomiques détruirait selon L. LISON (69), une partie des phosphatases (70 à 75 % de l'activité phosphatasique selon cet auteur). J.B. DALGAARD (27) et E.B. TAFT et coll. (104, 105, 106) confirment l'effet nocif de l'incubation dans la paraffine. E.B. TAFT et coll. (104) ont comparé les PME acide et alcaline d'un même tissu préparé, d'une part, par inclusion dans la paraffine, d'autre part, par congélation. Ils constatent que l'inclusion dans la paraffine réduit l'activité phosphatasique alcaline de 20 à 90 % et l'activité phosphatasique acide de 60 à 100 %.

Les travaux les plus récents remplacent l'inclusion dans la paraffine par la congélation (122, 99, 15, 105, 123, 96, 98, 33, 49, 46, 47).

Après la préparation des coupes, la fixation est entreprise. Or, les fixateurs ne sont pas sans action sur les activités PME. Le nombre des produits utilisables est grand. J.F. DANIELLI (29) en a fait une étude serrée. Il recommande, en particulier : la pyridine à 20 %, l'alcool éthylique à 70 %, le formol à 10 %, car ces produits sont moins nocifs. La fixation à l'acétone serait à rejeter. M. RABINOVITCH et D. ANDREUCCI (90) préfèrent les vapeurs de formol. A.M. RUTEMBERG et A.M. SELIGMAN (96), comme H. GREEN et E.L. VERNEY (47), utilisèrent le formol en solution salée hypertonique au cours d'un traitement de courte durée, ce qui doit permettre d'éviter des diffusions. Toutefois, toutes les opérations se terminent par des lavages à l'eau courante. A ce sujet, L. LISON (69) rappelle que les phosphatases se trouvent chez les êtres vivants sous deux formes : les lyoenzymes (solubles en milieu aqueux) et les desmoenzymes (insolubles). Il paraît donc inévitable que les multiples opérations de lavages auxquelles sont soumis les coupes et frottis entraînent la disparition des lyoenzymes (69). S.J. HOLT propose une fixation au formol, suivie d'un traitement par une solution hypertonique de sucre et de gomme arabique. Cette technique conserverait intégralement la PME acide (54).

3 - PROBLEME DU CHOIX DES SUBSTRATS.

Outre le glycérophosphate de sodium, d'autres sels ont été utilisés comme substrats par différents auteurs. Pour quelles raisons ?

Elles sont de deux ordres :

a) certains auteurs voulaient mettre en évidence des activités phosphatasiques spécifiques ;

b) d'autres voulaient trouver un substrat permettant de simplifier les techniques et d'éviter les diffusions.

Dans le premier groupe d'auteurs, nous citerons :

- H.W. DEANE, E.W. DEMPSEY (30) ainsi que E.W. DEMPSEY et G.B. WISLOCKI (31) qui ont utilisé le fructose -di-phosphate, l'acide adénylique, l'acide ribonucléique, la lécithine ;
- A. ZORZOLI et E. STOWELL (132) qui ont essayé de montrer l'existence d'une hexosediphosphatase individualisée ;
- E.J. KRUGELIS qui a eu recours aux substrats suivants : β glycérophosphate, acide adénylique, polynucléotides et oligonucléotides (après dépolymérisation par une désoxyribonucléase), acide ribonucléique (65) ;
- D. GLICK et E.E. FISCHER (40 et 41) qui ont étudié les adénosines triphosphatases ;
- G. GOMORI (45) qui s'est intéressé à une hexosediphosphatase rénale et hépatique ;
- T. TAKEUCHI et coll. (107, 108), qui ont utilisé du glucose-1-phosphate pour révéler une amylophosphorylase ;
- O.D. KOWLESSAR et coll. (64), qui ont comparé les localisations de la 5-nucléotidase et de la PME alcaline non spécifique ;
- M. WACHSTEIN et M. MEISEL (126), qui ont étudié dans le tissu hépatique les phosphatases non spécifiques, une 5-nucléotidase et une adénosine triphosphatase ;
- A. DUNCAN CHIUOINE (32) qui a été intéressé par la glucose-6-phosphatase.

Outre ces travaux, qui concernent des phosphatases individualisées, de nombreux travaux ont été consacrés à la recherche de substrats, autres que le glycérophosphate classique, qui permettraient de rendre plus fidèles les techniques histologiques.

J.F. DANIELLI (29), dans une remarquable étude, a indiqué les durées optimum, maximum et minimum, de chacune des phases dans la technique de GOMORI.

M. RABINOVITCH et D. ANDREUCCI (90) ont confirmé les temps donnés.

Plus récemment C. NUNZIANTE et A. GRANATA (86) ont étudié le cas particulier de l'application des techniques de G. GOMORI aux leucocytes. Tous ces auteurs insistent sur le respect des temps donnés pour éviter des diffusions. J.F. DANIELLI (29) s'est particulièrement intéressé à ce problème. Il a superposé deux couches minces, l'une, d'un tissu riche en phosphatases, l'autre, d'un tissu privé de phosphatases mais ayant une forte affinité pour le phosphate tricalcique, et les a traitées selon la technique de G. GOMORI. Il a constaté que la réaction n'était positive que dans la première coupe. Il n'y a donc pas diffusion extra cellulaire. Toutefois, pour simplifier la révélation de l'ion phosphorique, G. BOURNE (12) propose la visualisation du phosphate de calcium par l'apport d'alizarine rouge.

G. GOMORI, de son côté, a mis à l'épreuve la réaction de KOSSA qui utilise le nitrate d'argent pour révéler les sels de calcium (46).

En dépit des progrès déjà apportés, certains chercheurs discutent encore de la localisation des phosphatases révélés par les techniques type GOMORI; celles-ci n'empêcheraient pas les diffusions extracellulaires.

M.N. HANCOX et E. NICHOLAS (52) se sont penchés sur ce problème; leur travail a été commenté par J. VERNE et R. WEGMANN, dans un long exposé bibliographique (123).

D'où, l'emploi de nouveaux substrats couplés avec des techniques simplifiées. Ils peuvent se classer en plusieurs grands groupes suivant la nature chimique du corps employé.

Dans le groupe des dérivés du naphтол, nous citerons les travaux de M.L. MENTEN, M.H. GREEN et J. JUNGE (78) avec le naphtylphosphate de sodium; de L.S. KAPLOW (60) avec le α -naphtylphosphate de sodium; de J.F. BURTON (15) au naphtylphosphate pour la PME acide; de A.M. RUTEMBERG (96, 97), pour la PME acide, avec un benzoyl-naphtylphosphate de sodium; de B. MOMIS et A.M. RUTEMBERG (84), avec un naphtylphosphate pour la phosphatase alcaline. Le naphтол libéré est révélé par une diazoréaction avec une copule variant suivant les auteurs; ce sera une quinoléine (84) ou un colorant, le "fast blue BBN" (84), ou le diazofluoroborate de 5Cl-2-toluidine ou de 4Cl-2 anisidine ou de 4-benzamido-2-5-diméthoxyaniline (70).

Il est intéressant de rappeler les raisons de ces choix.

J.F. BURTON (15) a justifié sa technique, où les localisations sont acceptables sans diffusion, en invoquant une activation de la réaction de couplage avec un ralentissement de la libération enzymatique de naphтол. Le couplage rapide est réalisé, dans un milieu de pH 5,5 à 6,0, avec une forte concentration de sel de diazonium, à 37° en présence d'un dérivé quinoléique. Par contre, la libération du naphтол est ralentie par le choix de ce pH peu favorable et l'emploi d'une faible quantité de substrat. Ainsi, se trouve réalisée une surcharge du système de couplage aux points de forte activité enzymatique; le naphтол, dès son apparition, est fixé par le diazo réactif, ce qui empêche toute diffusion. De même le sel proposé par A.M. RUTEMBERG et A.M. SELIGMAN (96) est peu mais suffisamment soluble. Le naphтол, dès son apparition, donne, par copulation, un sel très insoluble. Les périodes d'incubation sont de courte durée et elles ont lieu dans des solutions salines hypertoniques: cela supprime toute diffusion.

Un dernier groupe utilise le phénylphosphate, ainsi: M.L. MENTEN, J. JUNGE et M.H. GREEN (78) ou L.H. MANHEIMER et A.M. SELIGMAN (73). Le radical phényl est ensuite mis en évidence par diazoréaction.

Un troisième type de corps a été proposé: le sodium indoxylphosphate qui est utilisable pour la phosphatase alcaline. L'activité enzymatique se révèle par l'apparition de dépôt bleu indigo.

En dehors de ces substrats, certains auteurs ont préconisé l'emploi de glycérophosphate marqué au phosphore -J.B. DALGAARD-

(26), la localisation du phosphore libéré étant révélée par histo-radio-graphie. De même T. BARKA et coll. (2) ont utilisé secondairement des sels de plomb et de thorium marqués.

Ainsi, les chercheurs ont essayé, en changeant de substrat, de rendre les techniques plus sensibles et plus fidèles. Une question se pose inévitablement : y a-t-il identité de résultats selon les substrats ? J.F. DANIELLI (29) a utilisé le β glycérophosphate et le phénylphosphate, dans les mêmes conditions opératoires pour un même tissu. Il a constaté l'identité des localisations dans les deux cas. N.M. HANCOX et E. NICHOLAS (52) ont, par contre, démontré que le glycérophosphate est hydrolysé plus rapidement que le phénylphosphate. A. ZORZOLI et E. STOWEL (132) ont observé de légères différences dans les localisations de la glycérophosphatase et d'une hexosediphosphatase. M.H. BURGOS (14) pense que l'enzyme hydrolysant le glycérophosphate n'est pas la même que celle qui hydrolyse le naphtylphosphate.

De plus, pour un seul et même substrat, différents auteurs (122) ont observé, selon le pH, des localisations différentes de l'activité enzymatique maxima. Pour H.W. DEANE, E.V. DEMPSEY, G.B. WISLOCKI (30, 31), il s'agirait de phosphatases distinctes. M.H. BURGOS (14) a démontré que les diverses phosphatases, mises en évidence par une méthode cytochimique, se comportaient différemment vis à vis d'inhibiteurs variés. G. GOMORI (46), pourtant, ne pense pas que des phosphatases alcalines différentes puissent être réellement démontrées cytochimiquement. Seule, l'utilisation d'un substrat spécifique peut mettre en évidence une phosphatase spécifique. S. LUGERSTEDT et V. STENRAM (66) utilisent des substrats différents. Ils pensent, eux que les réactions spécifiques présentées par diverses cellules n'indiquent pas nécessairement que ces réactions soient dues à des systèmes phosphatasiques divers.

Le débat reste donc largement ouvert.

B . LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

Dans l'introduction, nous avons déjà évoqué les premiers travaux consacrés aux phosphatases leucocytaires. Les auteurs employaient des techniques biochimiques inspirées des procédés classiques de mise en évidence des phosphatases. Rappelons-en le principe : le produit biologique renfermant l'enzyme est mis en présence d'une solution contenant un dérivé phosphoré organique servant de substrat.

Pour la phosphomonoestérase, on emploie soit du β glycérophosphate, soit du phényl phosphate. La solution où se produit la réaction est ajustée à un pH déterminé, favorable à l'enzyme. Ce pH est maintenu fixe par l'emploi de solutions tampons. Après un temps donné, la réaction est arrêtée. Le dosage des catabolites de l'action enzymatique

est alors pratiqué. Si le substrat est du glycérophosphate, c'est l'orthophosphate libéré qui est dosé. Si le substrat est du phénylphosphate, on peut, soit mesurer la richesse en orthophosphate, soit la richesse en groupement phényle. Plus forte est l'action enzymatique, plus importante est la quantité de substrat hydrolysé, plus élevé est le taux d'orthophosphate ou de dérivé phénolé libérés.

L'application de cette technique aux leucocytes appelle l'étude de certains aspects des processus opératoires proposés par divers auteurs. Aussi étudierons-nous ci-dessous :

- 1 - La préparation des leucocytes,
- 2 - La préparation des macrophages,
- 3 - Le problème de la libération des enzymes,
- 4 - Les substrats,
- 5 - Les pH.

1 - MODE D'OBTENTION DES LEUCOCYTES

Les expériences sont réalisées, soit avec des leucocytes provenant du sang circulant, soit avec des leucocytes inflammatoires.

a) Pour isoler des leucocytes du sang, de nombreuses techniques ont été proposées. Evoquons-les rapidement :

N. FIESSINGER (35) suivant, en cela, les indications de A.M. BUTLER et M. CUSHMAN (16), utilise la centrifugation avec aspiration du tapis leucocytaire, présent entre les hématies et le plasma.

F. SPEAR (101) propose une méthode de flottation utilisant de la gomme arabique, la centrifugation jouant le rôle d'agent physique.

W.J. HAIGHT et R.J. ROSSITER (51) étudient les procédés proposés par divers auteurs ; ils retiennent particulièrement ceux de A.M. BUTLER et M. CUSHMAN (que rappelle la technique de N. FIESSINGER), et de F. SPEAR. Au procédé de ce dernier va leur préférence.

E.S. BUCKLEY, M.J. POWELL et J.G. GIBSON (13) mettent au point un procédé dont le principe se fonde sur le fait suivant : la vitesse de sédimentation des hématies est augmentée si l'on ajoute au sang une fraction des protéides sériques, isolés et lyophilisés, la fraction "I" bovine. Dans ce cas, les hématies se séparent rapidement alors que les leucocytes surnagent et restent en suspension dans le plasma.

Citons encore les procédés dûs à A. WRIGHT (130) (par filtration), à A. FLEMING (36) (avec des tubes capillaires ou des tubes en V), à B.L. VALEE et coll. (115), à M. BESSIS (8, 9) (par ultra-centrifugation dans des tubes spéciaux), à B. MAUPIN (75, 76) (qui utilise les mousses), à J.P. SINGER et coll. (100) (qui emploient de la gramicidine et de la lysolécithine), à A.H. MINOR et L. BURNETT (par accélération de la sédimentation des érythrocytes) (81).

La technique due à ROBINEAUX et coll. (91) comporte trois temps :

- 1 - Une sédimentation spontanée des hématies en tube incliné (à 45°),

- 2 - Une centrifugation des leucocytes contenus dans le plasma surnageant le sédiment spontané des hématies, 1
- 3 - Une sédimentation spontanée, en tube vertical, des leucocytes provenant du culot de centrifugation du plasma (surnageant de la première sédimentation), leucocytes qui ont été remis en suspension dans l'eau physiologique après centrifugation. 1

b) Les leucocytes inflammatoires sont recueillis par J. de HAAN (50) à partir d'exsudats péritonéaux et par N. FIESSINGER et F. BOYER (35) à partir d'exsudats péritonéaux ou de suppurations. 1

2 - MODE D'OBTENTION DES MACROPHAGES

L'isolement des macrophages se fait à partir d'exsudats péritonéaux aseptiques de quatre jours, provoqués par l'injection au sein de la séreuse d'un produit non résorbable tel que l'huile de paraffine. 1 L'exsudat, recueilli par ponction, contient en suspension des macrophages qu'on peut séparer par centrifugation. 1 Ce mode opératoire est classiquement utilisé dans le service du Docteur DELAUNAY à l'Institut Pasteur de GARCHES. 1

3 - LIBERATION DES ENZYMES

Les suspensions en eau physiologique de cellules non lysées n'ont pas d'activité enzymatique. N. FIESSINGER et F. BOYER (35) ont proposé des passages alternatifs à 37° puis à 0°. 1 Les résultats de leurs expériences, opposés à la majorité des travaux postérieurs, s'expliquent probablement par l'emploi de ce mode opératoire. 1 Les cellules n'étaient peut-être pas "cassées" et leur contenu libéré, ou, à l'opposé, les cellules rompues, leur contenu était altéré par le traitement, ce qui détruisait les phosphomonoestérases. 1

R.J. ROSSITER et D.M. CRAM (25, 95) étudieront particulièrement ce problème : la saponine, certains dérivés sulfonés, les sels biliaries, les sulfates alcalins, seront tour à tour passés en revue. 1 En particulier le pouvoir inhibiteur de tous ces corps sera déterminé. 1

La saponine, recommandée par R.J. ROSSITER (95), sera aussi utilisée par W.S. BECK et W.N. VALENTINE (4, 115). 1

4 - SUBSTRATS

Les auteurs emploient, soit du β glycérophosphate de sodium (35, 88, 4), soit du phénylphosphate (63, 25, 51, 4). H. BEHRENDT a mis en évidence l'identité des résultats obtenus par ces deux dérivés (6). 1

5 - pH ET SOLUTIONS TAMPONS

Le pH des solutions contenant le substrat est variable suivant les auteurs. 1 Certains auteurs font une étude des variations en fonction du pH. 1 Leurs conclusions ne sont pas toujours identiques. 1 D'autre part

le problème des solutions tampons est rarement évoqué. Il nous paraît pourtant important. Nous reviendrons sur ce sujet plus loin.

Contentons-nous d'indiquer les pH utilisés par divers auteurs.

Pour la PME alcaline, J. ROCHE propose : 8,8 à 9,2 (93); G. GOMORI : 9,4 (44); L. LISON : 8,8 à 9,4 (69); M. WACHSTEIN : 9,2 (124); D.M. CRAM et R.J. ROSSITER : 10 (25); W.J. HAIGHT et R.J. ROSSITER : 9,9 (51); W.S. BECK et W.N. VALENTINE : 9,9 (4, 113); A.N. CESARO et A. GRANATA : 9,1 (18); L. CHEVILLARD : 9 avec le β glycérophosphate et 9,5 avec le dérivé α (19).

Pour la PME acide, G. GOMORI indique : 4,7 (44); L. LISON : 4,7 à 5,1 (69); D.M. CRAM et R.J. ROSSITER : 5 (25); W.J. HAIGHT et R.J. ROSSITER : 4,9 (51); W.S. BECK et W.N. VALENTINE : 5 (4, 115); A.N. CESARO et A. GRANATA : 4,6 (18); L. CHEVILLARD : 4 et 5,6 (19). Ce dernier fait donc état de deux phosphatases acides.



CHAPITRE II

LES RESULTATS OBTENUS

Que nous apprennent les auteurs ayant étudié les PME des leucocytes et des macrophages ?

Les thèmes sont très variés. Dans chaque groupe de travaux, nous présenterons et comparerons les résultats fournis. Lorsque des divergences apparaîtront, il sera bon de se rappeler les multiples facteurs influençant les techniques de mise en évidence par histochimie. Il en sera de même pour les résultats fournis par les deux grands types de modes opératoires histochimiques et biochimiques.

A - PME DES LEUCOCYTES

1 - LEUCOCYTES NORMAUX

a) Polynucléaires neutrophiles.

Les cellules humaines de ce type possèdent, selon tous les auteurs consultés, une PME alcaline.

Histologistes (44, 124, 87, 74, 122, 60, 112) et biochimistes (58, 51, 116, 119, 117, 118, 5, 83, 57, 4, 115), sont d'accord sur ce fait. Toutefois pour J. VERNE (122) "l'activité PME alcaline n'est pas une propriété constante des granulocytes neutrophiles du sang circulant. Elle apparaît dans ces leucocytes, à l'intérieur de certains organes, notamment : foie, poumons, muqueuse gastrique, surtout après action de substances entraînant un afflux leucocytaire et une leucopédèse (histamine, venin, bleu de trypan) et chez les rats porteurs de greffes cancéreuses. L'apparition de cette activité enzymatique pourrait correspondre à un état fonctionnel des leucocytes en question".

La présence d'une PME acide au sein des granulocytes neutrophiles humains a été signalée par R. IWATSURU et coll. (57) en 1939,

mais, G. GOMORI en 1941 n'a pu la mettre en évidence par histochimie dans ces cellules (43). Il est revenu plus tard sur cette opinion (46). Nombre de chercheurs confirment l'existence d'une PME acide au sein de polynucléaires (69, 25, 51, 4, 115, 18, 19).

En dehors des essais pratiqués sur l'homme, la recherche de ces enzymes a été effectuée chez divers animaux : on a constaté la présence constante de PME alcaline dans les polynucléaires neutrophiles du cobaye mais une présence inconstante chez le rat et le lapin (122, 124, 125). En ce cas, la réaction n'est positive que dans un certain nombre de cellules, ce nombre augmentant lorsqu'on prélève le sang près des plaies (122). Pour W.J. HAIGHT et R.J. ROSSITER (51), la richesse des polynucléaires de lapin en PME alcaline est plus grande que celle trouvée dans les mêmes cellules d'origine humaine (51).

Pour M. WACHSTEIN, il y a absence de PME alcaline au sein des polynucléaires neutrophiles de poulets, de souris et de chiens (124, 125).

b) Polynucléaires éosinophiles.

Plusieurs travaux d'ordre histochimique signalent l'absence de PME alcaline dans ces cellules (44, 124, 122, 60, 18). Opinion contradictoire exprimée dans des publications de travaux d'ordre biochimique (57, 58, 51).

c) Polynucléaires basophiles.

Pour les cytologistes il y a absence de PME alcaline (44, 60).

d) Lymphocytes.

Absence de PME alcaline (44, 124, 121, 122, 60).

e) Monocytes.

Absence de PME alcaline (44, 124, 122, 60).

2 - LEUCOCYTES ANORMAUX

Les grandes cellules mononucléées rencontrées dans la *mononucléose infectieuse* ne contiennent pas de PME alcaline (124, 44). Il en est de même en ce qui concerne les cellules rencontrées dans la *leucémie aiguë* (67, 62, 60) ou celles, immatures, trouvées dans les *leucémies myéloïdes chroniques* (124, 67, 62, 68, 122). Tels sont les résultats des travaux de cytologistes.

Les biochimistes nous enseignent que les suspensions leucocytaires provenant du sang de sujets atteints de *leucémie myéloïde aiguë* montrent une activité diminuée de la PME alcaline par rapport à celle d'une suspension de leucocytes issus d'un sang normal (5, 115, 119,

118, 79), la PME acide restant normale ou subissant une élévation (4, 115). Dans la *leucémie lymphoïde*, la PME alcaline des cellules blanches du sang est normale (58) ou abaissée (4, 115, 114). Il en est de même pour la PME acide (4, 115). Ces résultats sont apparemment en opposition avec ceux de LEONARDI qui a prétendu que les lymphocytes ou les polymphocytes de la *leucémie lymphoïde* possèdent une PME alcaline très active, alors que les cellules correspondantes donnent, par histochimie, des réactions négatives chez un individu sain (68). Peut-être est-il bon de rappeler ici que les travaux des premiers auteurs (58, 4, 115) ont été faits par biochimie, alors que LEONARDI a utilisé l'histochimie. Les premiers ont utilisé des suspensions de cellules circulantes, donc formées d'un mélange de cellules où dominaient les lymphocytes et les polymphocytes. Il est donc possible d'envisager la présence d'une PME alcaline lymphocytaire et polymphocytaire supérieure à la normale dans le cas de *leucémie lymphoïde*, mais restant faible par rapport à celle des polynucléaires. La richesse moyenne du groupe entier des cellules est alors inférieure, pour un même nombre de cellules, à celle d'un groupe de cellules provenant d'un sang normal, riche en polynucléaires. Les travaux de A.G. MESLIN et coll. (77) semblent confirmer cette hypothèse. Ces derniers auraient trouvé de fortes activités PME alcalines dans les *leucoses aigües* à la fois par techniques histochimiques et par techniques biochimiques (77).

Alors que les polynucléaires neutrophiles rencontrés dans les *leucémies myéloïdes chroniques* ont une richesse en PME alcaline diminuée (124, 67, 62, 68, 122, 4, 115, 119, 118, 80, 114), les mêmes cellules, ainsi que les métamyélocytes et les myélocytes, rencontrés dans les *polynucléoses*, la *maladie de HODGKIN*, ou les *métaplasies myéloïdes*, présentent une PME alcaline élevée (4, 115, 67, 79, 82), la PME acide restant normale (4, 115).

Histologistes et biologistes sont d'accord sur ce fait et proposent de différencier ainsi les *leucémies myéloïdes* des autres affections touchant les *granulocytes*, en particulier des *métaplasies*.

Toutefois, A.G. MESLIN et coll. attirent, à ce propos, l'attention sur la nécessité d'avoir des résultats particulièrement nets, et cela, par les deux types de techniques, histochimiques et biochimiques, exécutées avec une grande rigueur (77). Des modifications légères des techniques peuvent en effet influencer considérablement les résultats; les enzymes sont sensibles à l'action de multiples effecteurs.

3 - CELLULES SOUCHES

Pour les histologistes, les cellules souches de la moelle osseuse donnent une réaction négative pour la PME alcaline (59, 49, 124). Les faibles réactions positives signalées par certains auteurs ne seraient dues qu'aux polynucléaires arrivés à maturité et rencontrés dans la moelle (124).

M. RABINOVITCH et D. ANDREUCCI, toutefois, semblent avoir constaté une faible activité PME alcaline au niveau des *nucléoles* de certaines cellules souches (90). Les mêmes auteurs signalent l'existence d'une PME acide au niveau des granulations éosinophiles à divers

stades, et aussi dans les lymphocytes, les érythroblastes, les plasmocytes et les mégacaryocytes, la zone de GOLGI étant, semble-t-il, la zone de choix où siègerait l'enzyme.

Pour S. TRUBOWITZ et coll, les polynucléaires de la moelle osseuse seraient moins riches en PME alcaline que les polynucléaires circulants, la richesse en cet enzyme étant un test de maturité et de vieillesse des cellules (109).

4 - LEUCOCYTES NORMAUX AU COURS D'ETATS PATHOLOGIQUES

Les polynucléaires neutrophiles ont une richesse en PME alcaline augmentée (parfois considérablement) dans les polynucléoses (67, 128, 4, 115, 25, 119, 117, 118, 83, 114), les carcinomatoses (67), les anémies hémolytiques (67), la tuberculose (62), la maladie de PAGET (62), les myélomes (62), le diabète (68). Il en est de même dans la grossesse (74) où, non seulement les polynucléaires neutrophiles, mais les lymphocytes eux-mêmes donnent une réaction positive. Mêmes constatations au cours d'un stress (116, 112, 119, 117, 118) ou après injection d'ACTH. (116).

La surrénalectomie n'empêcherait pas la réaction de se produire, elle augmenterait au contraire son intensité (83).

5 - LOCALISATION INTRACELLULAIRE DE LA PME

Ce paragraphe ne fera que résumer les résultats fournis par les techniques histologiques.

Les auteurs ayant utilisé la technique de G. GOMORI, en particulier M. RABINOVITCH et D. ANDREUCCI, considèrent que dans les cellules à réaction positive, le noyau est la zone d'élection pour les deux phosphatases (90). Ces enzymes feraient défaut dans le cytoplasme (90). Cette constatation a été très discutée par divers chercheurs qui ont reproché à la technique de G. GOMORI de ne pas être capable de révéler le lieu exact où réside l'enzyme (121, 123). Il y aurait, étant donné la durée des diverses phases opératoires, diffusion intracellulaire du phosphate de calcium formé qui s'amasserait autour du noyau. La localisation nucléaire ne serait donc qu'un artéfact. Pour nombre d'auteurs (R. VERCAUTEREN, L.S. KAPLOW, A.N. CESARO et A. GRANATA) qui utilisaient des techniques variées à temps d'action raccourcis (voir ci-dessus), le cytoplasme des polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles contiendrait une PME alcaline (121, 60, 18, 85); toutefois, pour L.S. KAPLOW, la positivité du cytoplasme ne serait pas un caractère constant (60). Les mêmes auteurs n'ont jamais révélé la présence de PME alcaline dans le noyau (121, 60, 18). La localisation nucléaire de la PME alcaline semble donc être inexacte. Ainsi seraient confirmés les reproches faits à la technique de G. GOMORI. Par contre A.N. CESARO et A. GRANATA auraient trouvé que la PME acide, dans les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, siégerait au sein du noyau (18).

Les granulations cytoplasmiques spécifiques, neutrophiles et éosinophiles, sont négatives pour la PME alcaline (90, 122). Les granulations éosinophiles montrent une PME acide constamment présente (90). La même phosphatase serait parfois absente au niveau des granulations neutrophiles (90, 122). Les nucléoles seraient positives pour la PME acide, négatives pour la PME alcaline (90). Les chromosomes renferment des PME acide et alcaline (90). De même les noyaux en division contiendraient une PME alcaline (85).

6 - CAS PARTICULIER DES POLYNUCLEAIRES INFLAMMATOIRES

Nous avons déjà signalé que les cellules retirées du sang circulant au cours des phénomènes infectieux qui ont provoqué une hyperleucocytose sont particulièrement riches en PME alcaline (67, 5, 4, 114, 25, 119, 117, 118, 83, 68, 122).

Même constatation si l'on considère les polynucléaires *humains* rencontrés autour d'une plaie saignante (34) ou suppurée (124, 60), autour d'une brûlure (17) ou d'une fracture (75, 76), tout au moins les 10 premiers jours d'évolution.

Toutefois R.M.H. Mac MINN et E.R. JOHNSON n'ont pas retrouvé de phosphatase alcaline au niveau de blessures saignantes siégeant sur les viscères de la cavité abdominale du chat, que le tissu réactionnel soit en voie de développement ou arrivé à maturité. Un fait analogue a été constaté par les mêmes auteurs au niveau de lésions cutanées. On est donc conduit à envisager une différence d'espace à espèce pour ce type de réactions (72). Les auteurs en question ont suggéré l'existence d'un facteur local inconnu influençant ces réactions plutôt que des différences fondamentales dans les processus fibrinogénétiques, suivant les tissus et les espèces animales (72). Il serait peut être utile de rappeler ici les travaux de E. HENRICKSEN : celui-ci n'a pu révéler de phosphatase dans les fibroblastes du coeur de poulet en culture que lorsque ces cellules étaient en voie de dégénérescence (53).

Dans le même ordre d'idée, les travaux de J.F. DANIELLI et coll. ont signalé une diminution de la richesse en PME alcaline dans les granulomes inflammatoires provoqués chez des animaux en avitaminose C (28).

7 - PHAGOCYTOSE

Les variations métaboliques, qui se produisent au niveau des phagocytes lors d'un processus de phagocytose, ont toujours intéressé les chercheurs. Ainsi, a-t-on constaté des modifications de la consommation d'oxygène (1, 102), ces modifications étant plus ou moins importantes suivant les types cellulaires (102). De même, S. BAZIN, A. DELAUNAY et C. AVICE ont démontré qu'il y avait consommation de glycogène intracellulaire au cours de la phagocytose (3).

La richesse en PME a été étudiée par divers auteurs. H.J. BECKER, G. MUNDER et H. FISCHER, utilisant des leucocytes de sang circulant, constatent que ces cellules au repos, contiennent

moins de PME alcaline que celles qui ont phagocyté des germes (5). D'autre part comme nous l'avons déjà dit, on s'accorde à reconnaître une PME augmentée dans tous les granulocytes inflammatoires siégeant auprès d'une plaie ou d'une lésion avant toute phagocytose (38, 119, 117, 118, 83). De même, une publication récente due à K. ZAZRZEWSKI et coll., a montré que la phagocytose ne modifie pas le turnover des esters phosphoriques au niveau des leucocytes (131).

8 - ACTION DU FROID

La congélation, puis la décongélation, exaltent l'activité de la PME alcaline des leucocytes du sang de cheval (127). La congélation, d'autre part, permet la conservation de l'enzyme pendant plusieurs mois (127).

9 - INFLUENCE D'EFFECTEURS VARIES

Parmi les activateurs classiques des phosphomonoestérases alcalines, nous devons signaler que les PME alcalines leucocytaires sont sensibles aux suivants :

Le magnésium (25, 129); *la glycine* aux faibles concentrations (11, 25) *l'aminoptérine*, et, en général, tous les composés antifoliques (leur action est abolie par l'acide folique (25); *le chlorhydrate de tétraéthylammonium* (129).

Parmi les inhibiteurs, signalons : *les cyanures* (25, 129); *le zinc* (25, 55); *l'acide borique* et *les borates*; *les phosphates*; *les sels biliaires*; *la glycine* à de fortes concentrations (25); *les oxalates* (94).

Parmi les indifférents, nommons : *les fluorures* (94, 25); *les saponines* (25).

B - PME DES MACROPHAGES

Jusqu'à présent les PME macrophagiques n'ont guère retenu l'attention. Les seuls travaux publiés ont mis en oeuvre des méthodes de détection histochimiques. Encore, ne vont-ils pas sans présenter, de l'un à l'autre, d'importantes contradictions (20, 59, 39). Les conditions opératoires étant, d'autre part, très variables, il nous semble de peu d'intérêt de rapporter ici leurs conclusions.

★
★ ★

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE I

PRESENTATION DES TRAVAUX EFFECTUES

Nous venons de voir que les *polynucléaires* ont déjà été l'objet de nombreux travaux. La lecture du précédent chapitre nous a montré aussi que l'on discute encore sur l'intérêt des techniques histo-chimiques pour localiser les phosphatases. Les résultats rapportés par divers auteurs sont souvent contradictoires : par exemple, à propos de l'existence d'une PME acide au sein des polynucléaires neutrophiles, ou des variations de la richesse de ces mêmes cellules en PME alcaline, au cours de la phagocytose. Enfin certains points sont restés dans l'ombre : le sort de la PME acide lors de la phagocytose, par exemple.

Les macrophages, second grand type de phagocytes, n'ont été que peu étudiés.

L'intérêt offert par le problème des PME phagocytaires nous est ainsi apparu en pleine lumière.

Conseillé par le Docteur DELAUNAY et Mademoiselle BAZIN, il nous a semblé intéressant de reconsidérer certains aspects du problème des PME leucocytaires et d'étudier les PME macrophagiques.

A - LES CELLULES CHOISIES

Deux grands types de cellules ont été utilisés.

1 - *DES POLYNUCLEAIRES* recueillis dans les exsudats inflammatoires : ces cellules, qui proviennent du sang circulant, parviennent dans les exsudats par passage à travers la paroi vasculaire (diapédèse).

2 - *DES MACROPHAGES* recueillis dans les exsudats inflammatoires dont l'origine remonte au moins à trois jours. Ces cellules, nous l'avons déjà dit, reconnaissent plusieurs sources ; ils peuvent en effet résulter d'une métamorphose de nombreux éléments

conjonctifs : histiocytes, fibroblastes, certaines cellules endothéliales, épithéliales et même musculaires.

Les monocytes du sang circulant peuvent aussi se transformer en macrophages : ils pénètrent dans l'exsudat par diapédèse.

Notre choix s'est porté sur les polynucléaires et les macrophages des exsudats parce que ces cellules sont d'une manipulation relativement facile. On peut assez aisément préparer des suspensions dont la composition cytologique est constante et de détermination aisée. Leur richesse peut être connue par simple numération.

B - LES PROBLEMES ETUDIES

1 - DETERMINATION DES pH OPTIMUM DES DIVERSES PME

Nous avons vu, dans le rapport historique, que les valeurs de pH étaient, ici, très variables suivant les auteurs. Pour essayer de rendre nos mesures aussi rigoureuses que possible, il nous a fallu, au préalable étudier avec soin la technique employée, en particulier le problème des solutions tampons. Nous avons été conduit, pour finir, au choix de deux tampons différents.

2 - MISE EN EVIDENCE DU ROLE DE CERTAINS EFFECTEURS

L'action de certains effecteurs chimiques sur l'activité phosphomonoestérasique est un phénomène bien connu (24), ce qui permet d'ailleurs de caractériser les PME (22, 23).

Pour l'étude de certains effecteurs chimiques, nous avons repris les travaux de D.M. CRAM et R.J. ROSSITER (25), de E. WILTSHAW (129). Nous avons aussi étudié l'action d'un agent physique : le froid.

3 - INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS BIOLOGIQUES

Les extraits d'organes, qui stimulent les réactions métaboliques des cellules conservées in vitro ont-ils une influence sur les PME leucocytaires ?

Les animaux scorbutiques montrent une moindre résistance à l'infection. Leurs plaies se réparent mal. L'avitaminose C se traduit-elle aussi par une modification de la richesse en PME des polynucléaires inflammatoires ?

Tels sont les deux thèmes dont l'étude expérimentale a été abordée sous cette rubrique.

4 - LE PROCESSUS DE LA PHAGOCYTOSE

Deux raisons nous ont attiré vers ce sujet.

En premier lieu, parce qu'il avait été démontré, dans le laboratoire du Docteur DELAUNAY, que les polynucléaires neutrophiles, riches en glycogène consomment rapidement cette substance au cours de la phagocytose. En second lieu, parce que les travaux de divers auteurs sont contradictoires lorsqu'il s'agit de PME.

C - LES TECHNIQUES UTILISEES

Le choix des cellules et des problèmes à considérer étant fait, il convenait de rechercher une technique appropriée.

Nous avons délibérément délaissé les techniques histochemiques. Plusieurs raisons à cela. Tout d'abord, notre spécialisation de biochimiste et de biologiste habitué au dosage des PME sériques. Puis, l'imprécision relative des méthodes de mesures histochemiques. Le fait aussi que les techniques histochemiques sont finalement adaptées à de simples déterminations qualitatives. Enfin, n'oublions pas que la lecture de l'historique montre beaucoup d'obscurité en ce qui concerne la validité des localisations et, secondairement, des mesures d'activités PME intracellulaires.

En somme, nous avons retenu une technique biochimique par affinité personnelle, par connaissance de la valeur indiscutable des techniques classiques de dosage des PME sériques dûes à O. BODANSKY (10) et à J. COURTOIS et M. PLUMEL (21), par constatation de la possibilité d'adapter ces techniques au cas particulier des suspensions de cellules phagocytaires.

A la mise au point précise de cette technique, nous consacrerons le prochain chapitre.



CHAPITRE II

MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'ETUDE

A - PRINCIPES GENERAUX DE LA TECHNIQUE UTILISEE

Un ml. de suspension homogène des éléments cellulaires dans de l'eau physiologique saponinée (la richesse en cellules en ayant été déterminée par numération) est introduite dans 7 ml. d'une solution tampon, au pH voulu, qui contient du glycérophosphate de sodium en solution. L'ensemble est maintenu au bain-marie à 37° pendant une heure. La réaction est arrêtée par addition de 2 ml. d'une solution à 20 % d'acide trichloracétique. L'ensemble est filtré. Sur le filtrat est effectué un dosage de l'orthophosphate libéré. Un témoin est préparé parallèlement pour chaque dosage. Il est arrêté au temps 0 par apport immédiat d'acide trichloracétique. La différence entre les deux dosages indique la quantité d'orthophosphate libéré par les PME étudiées. La quantité d'orthophosphate libéré est ensuite calculée pour 1×10^6 leucocytes.

Ceci dit, examinons avec précision la mise en oeuvre de la réaction enzymatique, puis le dosage de l'orthophosphate libéré.

B - REACTION ENZYMATIQUE

Nous passerons en revue dans les paragraphes qui vont suivre, tour à tour :

- 1 - Le matériel ;
- 2 - Les facteurs d'ordre physique qui interviennent dans la réaction ;
- 3 - Le substrat ;
- 4 - La solution tampon ;
- 5 - La nature du liquide où les cellules sont mises en suspension ;
- 6 - La détermination de la teneur en cellules ;
- 7 - L'importance de cette teneur.

1 - LE MATERIEL

a - *Le bain-marie* : à température constante de 37°, avec des écarts de l'ordre de $\pm 0^{\circ}5$.

b - *La verrerie* : Nous ne ferons que rappeler les précautions usuelles qui concernent la propreté de la verrerie. Celle-ci était lavée à l'eau courante, passée dans un bain de carbonate de soude, traitée ensuite par une solution de ClH , rincée enfin plusieurs fois de suite à l'eau distillée. Le séchage était réalisé à l'abri des poussières.

2 - FACTEURS PHYSIQUES QUI INTERVIENNENT DANS LA REACTION

a - *pH optimum d'action* : On sait que les activités PME sont fortement influencées par le pH de la solution où se déroule la réaction. Le pH optimum d'action est même une des caractéristiques des enzymes en question. Nous indiquerons donc, à propos de chaque groupe de cellules étudiées dans ce travail, les expériences qui ont été faites pour déterminer ces pH optimum.

Les pH de nos solutions étaient obtenus par l'emploi de tampons de formules variées. Ils seront désignés dans le texte le moment venu.

La détermination des pH était effectuée au début et à la fin de la réaction enzymatique avec un pH-mètre électrométrique type ADSUL, équipé avec une électrode de verre.

b - *La température* : Nous avons choisi la température de 37° puisqu'elle est classique pour ce genre d'expériences.

c - *Durée de l'expérience* : Nous avons, en règle générale, adopté pour l'incubation de nos tubes au bain-marie, le temps de 1 heure. Il était nécessaire de trouver des conditions opératoires telles que les quantités d'orthophosphate libéré en permettent le dosage avec suffisamment de précision et que l'action de l'enzyme soit constante pendant cette période. Aussi avons nous étudié la cinétique de la réaction dans nos conditions opératoires. Ces expériences seront rapportées, en leur temps, pour chaque type de cellules.

3 - LE SUBSTRAT

Nous avons utilisé le glycérophosphate de sodium du Codex (mélange, en proportions variables, de sels de sodium des deux acides glycérol-mono-phosphoriques α et β). Ces deux sels ont des degrés d'hydratation différents.

Le sel α : 6 OH_2 (PM = 324)

Le sel β : 5 OH_2 (PM = 306).

Toutes nos expériences ont été exécutées avec le même glycérophosphate. Pour celui-ci, nous avons adopté le poids moléculaire moyen de 310 (contenant donc 10 % de P minéral).

La concentration en glycérophosphate a été déterminée d'après les résultats de l'étude de la cinétique de la réaction (voir plus loin les chapitres consacrés à chaque type de cellules) et ceux de deux expériences particulières que nous rapporterons dès maintenant.

La richesse en glycérophosphate du substrat conditionne la quantité d'orthophosphate libéré par les PME. Ce fait apparaît particulièrement net si l'on compare les tableaux 1 et 2.

TABEAU N° 1 (*)

Tampon alcalin : 1 - Glycine 0,1 M à pH 9,4

2 - Véronal sodique 0,1 M à pH 9,4

Tampon acide : 3 - Glycine 0,1 M à pH 4,6

4 - Acide acétique--acétate de Na 0,1 M à pH 4,55

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,05 M pour la PME alcaline
0,025 M " " " " acide

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension contenant 11×10^6 éléments/ml provenant de plusieurs cobayes normaux.

	En milieu alcalin		En milieu acide	
Temps d'incubation	P min. libéré par 1×10^6 leucocytes (en μg) avec tampons :			
	n° (1)	n° (2)	n° (3)	n° (4)
0	00	0	0	0
30'	9,90	13,25	2,30	2,30
1 H.	21,00	27,00	4,35	4,70
1 H. 30	28,00	37,00	5,70	5,70
2 H.	35,50	47,50	6,80	7,05
2 H. 30	40,50	54,00	8,60	8,85
3 H.	48,50	54,20	7,60	7,70
3 H. 30	52,50	54,50	7,30	7,50

(*) Le dosage d'orthophosphate libéré a été fait selon la technique de BRIGGS dont l'exposé sera traité en détail à la page 45. Les résultats sont exprimés en μgr de P minéral.

TABLEAU N° 2 (*)

Tampon alcalin : 1 - Glycine 0,1 M à pH 9,4

2 - Véronal 0,1 M à pH 9,4

Tampon acide : 3 - Glycine 0,1 M à pH 4,6

4 - Acide acétique-acétate de Na 0,1 M à pH 4,6

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,2 M pour les deux PME

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension contenant 10×10^6 éléments/ml provenant de plusieurs cobayes normaux.

	En milieu alcalin		En milieu acide	
Temps d'incubation	P min. libéré par 1×10^6 leucocytes (en μg) avec tampons :			
	n° (1)	n° (2)	n° (3)	n° (4)
0	0	0	0	0
30'	12,70	17,10	5,80	6,40
1 H.	27,50	33,70	13,50	12,70
1 H. 30	41,50	40,20	17,20	18,20
2 H.	55,00	54,00	22,70	22,70
2 H. 30	65,00	67,00	-	28,00
3 H.	75,50	69,00	28,50	33,50
3 H. 30	83,00	74,00	35,00	39,50
4 H.	93,50	87,00	38,00	42,00

(*) Le dosage d'orthophosphate libéré a été fait selon la technique de BRIGGS dont l'exposé sera traité en détail à la page 45. Les résultats sont exprimés en µgr de P minéral.

Dans le tableau 1 la quantité de glycérophosphate utilisée comme substrat est 8 fois plus faible que dans le tableau 2 pour le milieu acide et 4 fois plus faible pour le milieu alcalin. Sans doute, les leucocytes n'étaient pas de même origine dans les deux cas. Néanmoins les différences de résultats se montrent suffisamment importantes pour attirer l'attention. Les variations du rapport Phosphatase/substrat doivent donc être étudiées pour une même durée d'incubation.

Les résultats de ces expériences ont été réunis dans les deux tableaux suivants :

Première expérience : Tableau n° 3

Deuxième expérience : Tableau n° 4

TABLEAU N° 3

Tampons : 1 - Véronal M à pH 8,9

2 - Acide acétique-acétate de Na M à pH 4,9

Substrat : Glycérophosphate de Na à concentrations diverses

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension contenant $11,2 \times 10^6$ éléments/ml.

a	b	c	d	e	f	g	h	i
Concentration du glycéro- phosphate de Na	P min. (en μg) du glycéro- phosphate de Na		En milieu alcalin			En milieu acide		
			P min. libéré (en μg)			P min. libéré (en μg)		
	Total	Pour 1×10^6 cell.	Total	Pour 1×10^6 cell.	%	Total	Pour 1×10^6 cell.	%
5×10^{-2} M	12.000	1.070	415,00	37,00	3,45	260,00	23,00	2,15
$3,75 \times 10^{-2}$ M	9.000	805	390,00	35,00	4,35	240,00	21,50	2,70
$2,50 \times 10^{-2}$ M	6.000	535	360,00	32,00	6,00	215,00	19,25	3,30
$1,25 \times 10^{-2}$ M	3.000	268	320,00	28,50	10,65	170,00	15,25	5,30
$6,25 \times 10^{-3}$ M	1.500	135	210,00	19,00	14,00	66,00	5,90	4,40
$3,125 \times 10^{-3}$ M	750	67	160,00	14,50	21,30	14,00	1,25	1,80

TABEAU N° 4

Tampons : 1 - Véronal M à pH 8,9

2 - Acide acétique-acétate de Na M à pH 4,9

Substrat : Glycérophosphate de Na à concentrations diverses

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension contenant 22×10^6 éléments/ml.

a	b	c	d	e	f	g	h	i
Concentration du glycéro- phosphate de Na	P min. (en μg) apporté par le glycérophosphate		En milieu alcalin			En milieu acide		
			P min. libéré (en μg)			P min. libéré (en μg)		
	Total	Pour 1×10^6 cell.	Total	Pour 1×10^6 cell.	%	Total	Pour 1×10^6 cell.	%
2×10^{-1} M	48.000	2.180	1.025	46,50	2,13	900	41,00	1,90
$1,5 \times 10^{-1}$ M	36.000	1.635	1.070	48,50	2,97	660	30,00	1,85
1×10^{-1} M	24.000	1.090	1.120	51,00	4,65	590	27,00	2,50
$7,5 \times 10^{-2}$ M	18.000	820	1.175	53,50	6,55	550	25,00	3,00
5×10^{-2} M	12.000	545	1.055	48,00	8,80	485	22,00	4,00
$2,5 \times 10^{-2}$ M	6.000	275	670	30,50	11,20	400	18,25	6,50

Conclusions :

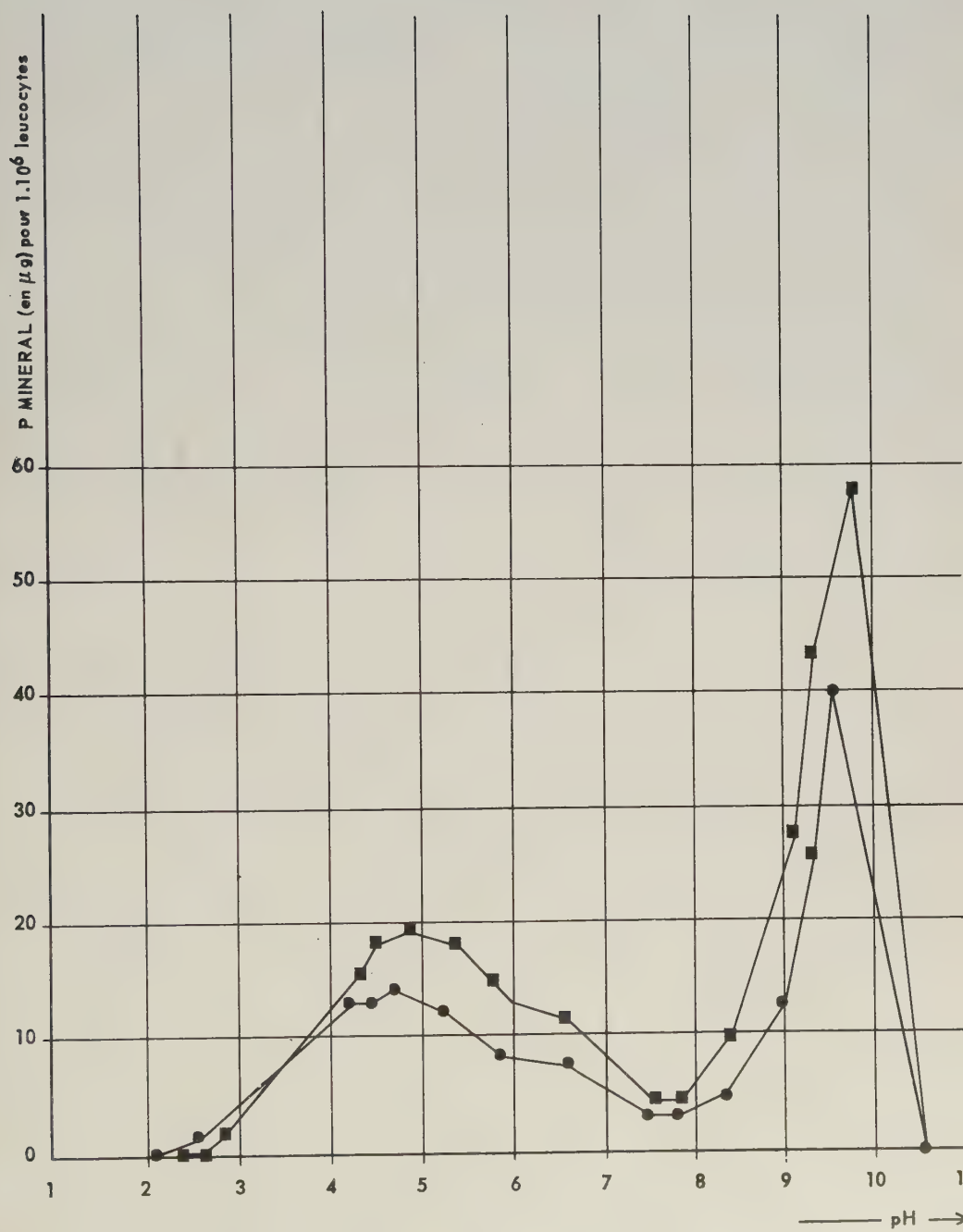
Pour une même richesse en enzyme et pour une même durée d'incubation, la quantité d'orthophosphate libéré est conditionnée par la richesse du substrat en glycérophosphate. Les expériences doivent se faire dans les mêmes conditions opératoires, en particulier, il faut que la richesse du substrat en glycérophosphate, au départ, soit constante et telle que, pour une durée de 60 minutes, le pourcentage de substrat hydrolysé ne dépasse pas 10 %. Il faut de même, pour assurer un rapport constant Phosphatase/glycérophosphate, que le nombre des leucocytes en expérience demeure sensiblement le même.

Ces données acquises, nous avons adopté :

1 - La solution de glycérophosphate de Na à 6,20 gr.% (0,2 M), telle qu'après dilution dans le tube réactif la concentration soit de 0,025 M;

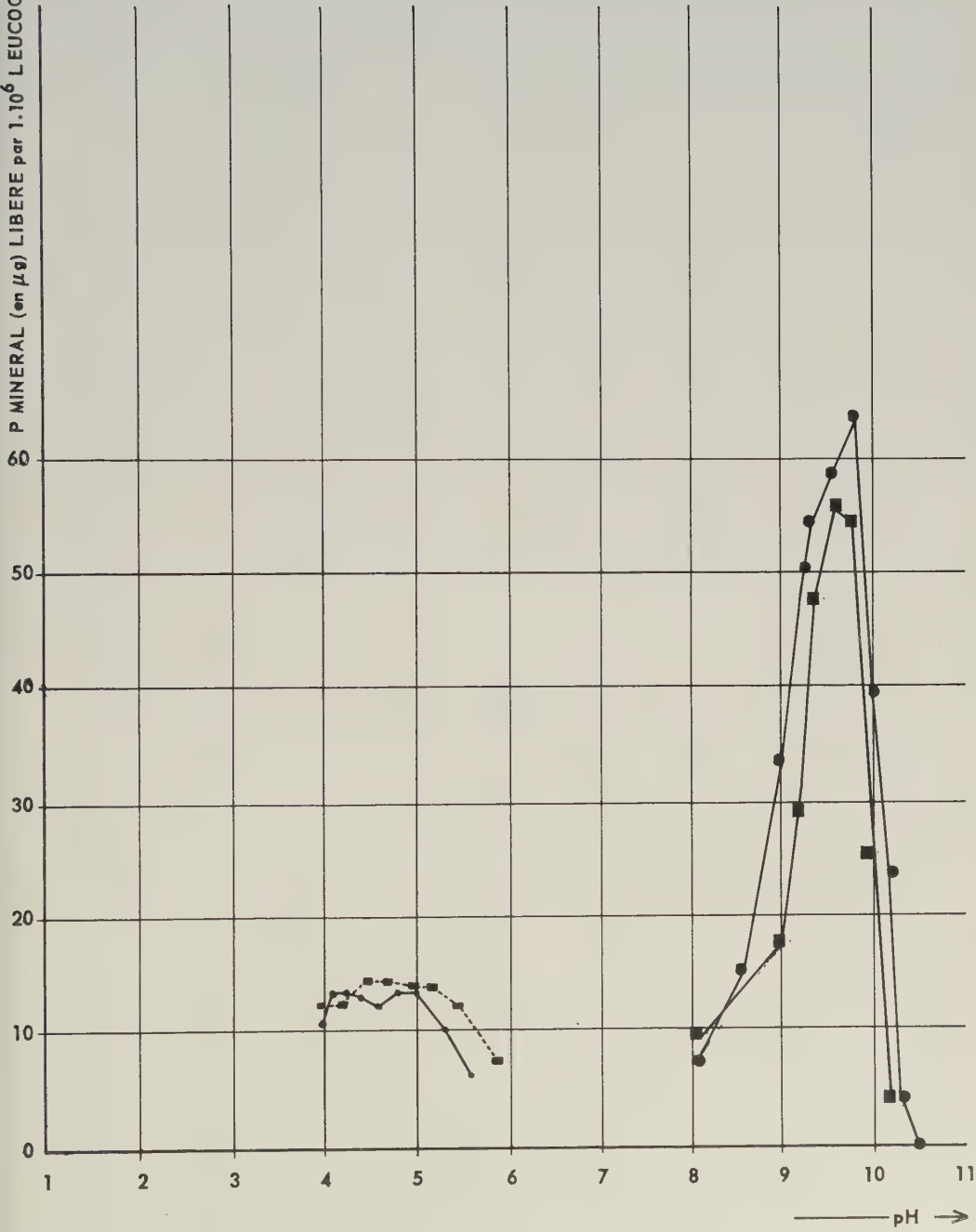
2 - Un nombre de leucocytes constant : à quelques leucocytes près 10×10^6 cellules/ml (voir à ce sujet des expériences complémentaires ultérieures).

FIGURE 1



P MINERAL (en μg) LIBERE par 1.10^6 LEUCOCYTES

FIGURE 2



4 - LES SOLUTIONS TAMPONS

L'existence de pH favorables au développement des réactions enzymatiques est une notion, entre toutes, classique. Nous avons, par conséquent, été amenés à les déterminer pour les PME étudiées. Mais de telles recherches ne sont possibles que grâce à l'emploi de solutions solidement tamponnées. C'est l'étude particulièrement longue de plusieurs tampons que nous résumerons maintenant.

a - *Essais préliminaires* : Une première série d'essais nous a montré dans la gamme des pH l'existence de deux zones optimum.

Une série de tubes était préparée.

Chaque tube contenait :

1 ml de sol. de glycérophosphate de Na 0,2 M (6,20 %)
0,5 ml de sol. saponinée à 2 % dans l'eau physiologique
0,5 ml de sol. de chlorure de Mg 0,02 M (0,40 %)
Quantité variable de solution acide ou alcaline (inférieure à 5 ml)
qsp 10 ml avec de l'eau physiologique.

Pour chaque type de solution acide ou alcaline, donc pour chaque pH, quatre tubes étaient retenus.

Deux recevaient 1 ml d'une suspension leucocytaire en eau physiologique. Le troisième recevait seulement 1 ml d'eau physiologique. Puis, après une heure de séjour au bain-marie, à 37°, étaient ajoutés à chaque tube, 2 ml d'acide trichloracétique à 30 %. Le dosage de l'orthophosphate était enfin exécuté sur le filtrat. Nous utilisons le quatrième tube pour déterminer le pH de chaque série. Il nous faut préciser ici que ces déterminations étaient faites au moment de la préparation des tubes c'est-à-dire à l'Hôpital Saint-Louis de Paris et non à l'Institut Pasteur de Garches où se déroulait la phase enzymatique. Les pH indiqués dans les tableaux ci-dessous sont donc les valeurs de départ.

Au total nous nous sommes livrés à deux séries de dosages.

Ils sont résumés sur la figure n° 1.

Des essais complémentaires, suivant le même processus opératoire ont été pratiqués. Les résultats ont été reportés sur les courbes de la figure n° 2.

Conclusions : Bien que les valeurs absolues réelles des pH, pendant et après l'action enzymatique, nous soient restées inconnues, nous avons estimé que ces essais étaient valables en valeur relative. Il semble donc que deux zones de pH optimum existent, d'une part dans la zone acide autour de pH 4 et d'autre part dans la zone alcaline au dessus de pH 9.

Par là, nous nous trouvons conduits à rechercher des milieux tamponnés à des pH divers, bien stabilisés. En pratique ce problème s'est révélé particulièrement difficile. Il nous a obligé à envisager l'emploi de tampons multiples.

b - Les tampons alcalins : Nous avons songé immédiatement à employer le tampon véronal-véronal sodique qui est classique dans les conditions où nous opérons. Il offrait, par contre, l'inconvénient de ne donner à l'ensemble des réactifs que le pH de 9,8 pour la concentration 0,5 M, de 9,6 pour 0,1 M et de 9,5 pour 0,05 M.

D'un autre point de vue, comme nous étions obligés d'opérer, sur la foi de nos premiers résultats, dans une zone dépassant le pH de 9, le tampon en question se montrait peu maniable. Ajoutons qu'il est en général de mauvaise conservation et d'une stabilité insuffisante. Nous avons à ce moment envisagé l'emploi d'un tampon universel, celui-ci devant nous permettre, avec une seule solution de base, d'obtenir toute la gamme de pH désirable en milieu acide comme en milieu alcalin. Nous inspirant du tampon universel de BRITTON et ROBISON, nous avons préparé un tampon composé d'acide sulfurique, d'acide acétique, d'acide borique et de glycine. Mais nous n'avons pas tardé à constater que les valeurs qu'il donnait étaient nettement inférieures à celles obtenues avec le véronal. Finalement nous avons préparé des tampons divers dans lesquels un des corps cités ci-dessus manquait. L'étude comparative des activités PME au même pH nous a montré, chemin faisant, que l'acide borique se comportait comme un inhibiteur puissant de la PME alcaline des leucocytes. L'expérience dont nous allons parler à présent confirme ce fait. Elle comportait l'usage de solutions tampons ayant les deux formules suivantes :

1) Tampon glycine boraté.

a) Sol. de base (glycine 0,4 M)	[SO ₄ H ₂ N/10 CH ₃ COOH pur ac. borique glycine H ₂ O dist.	15 ml 24 ml 25 gr 30 gr qsp 1000 ml
b) Sol. tampon utilisée (glycine 0,16 M)	[Sol. de base NaOH N H ₂ O dist.	40 ml 35 ml qsp 100 ml

2) Tampon glycine sans borate

a) Sol. de base (glycine 0,4 M)	[SO ₄ H ₂ N/10 CH ₃ COOH pur glycine H ₂ O dist.	15 ml 24 ml 30 gr qsp 1000 ml
b) Sol. tampon utilisée (glycine 0,16 M)	[Sol de base NaOH N H ₂ O dist.	40 ml 19 ml qsp 100 ml

Dans le tube se trouvaient :

Sol. tampon	5 ml
Sol. de Cl ₂ Mg (ou eau dist.)	1 ml
Sol. de glycérophosphate (0,2 M)	1 ml
Suspension leucocytaire	1 ml

en haut de la colonne correspondante.

pour la PME acide (voir page 38)

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : $\text{Cl}_2\text{Mg } 2,25 \times 10^{-3} \text{ M}$ ou néant

Leucocytes : 8×10^6 éléments/ml

N° des tubes	Borate	Cl ₂ Mg	pH obtenus	P minéral libéré (en µg) par 1×10^6 leucocytes
A	+	+	9,55	18,50
B	0	+	9,50	48,00
C	+	0	9,55	17,30
D	0	0	9,50	41,00
E	+	+	4,70	16,50
F	0	+	4,80	18,60
G	+	0	4,75	16,10
H	0	0	4,80	17,80

Conclusions : Si l'on compare les tubes A et B, on note aussitôt l'importante influence inhibitrice de l'acide borique sur la PME alcaline. De même pour les tubes C et D. La comparaison entre A et C montre en outre que l'action activatrice classique du Mg est beaucoup plus sensible en l'absence d'acide borique. Même conclusion pour les tubes B et D.

Entre temps, nous avons étudié l'emploi de divers autres tampons (sucrate de Na et saccharinate de Na). Notre attention avait été attirée par le paraminobenzène sulfamide (Septoplax) en solution alcaline tamponnée par l'acide acétique dilué. Nous nous sommes arrêtés à la formule de préparation suivante :

a) Sol. de base
(0,4 M)

Soude, 0,4 N
Sulfamide 12 gr

La dissolution était faite à chaud, puis on laissait refroidir :

On filtrait.

b) Sol. tampon
($2,5 \times 10^{-2} M$)

Sol. de base
CH₃COOH N/10
H₂O dist. '

12,5 ml
9 ml
qsp 200 ml

Nous avons alors, pour une même suspension leucocytaire, comparé ce tampon avec le tampon véronal 0,1 M et glycine 0,1 M, seuls ou assemblés deux à deux et pour chacun d'eux, avec ou sans Cl_2Mg .

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

TABEAU N° 6

Tampon : divers (voir ci-dessous)

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M ou néant

Leucocytes : 8×10^6 éléments/ml

Produits utilisés	Véronal	Glycine	Sulfa- mides	Cl_2Mg	pH	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes
Concen- trations	$6,25 \times 10^{-2}\text{M}$	$6,25 \times 10^{-2}\text{M}$	$1,55 \times 10^{-2}\text{M}$	$2,5 \times 10^{-3}\text{M}$		
A	+	0	0	0	9,60	40,75
B	0	+	0	0	9,55	40,50
C	0	0	+	0	9,40	27,75
D	+	0	0	+	9,55	51,00
E	0	+	0	+	9,45	47,25
F	0	0	+	+	9,40	31,00
G	+	+	0	0	9,55	29,50
H	+	0	+	0	9,60	21,50
I	0	+	+	0	9,50	21,75
J	+	+	0	+	9,50	35,75
K	+	0	+	+	9,60	24,00
L	0	+	+	+	9,50	27,75

L'étude de ce tableau montre que :

- 1 - Le paraminobenzène sulfamide inhibe l'action phosphatasique : comparaison entre C et A (ou B) ; F et D (ou E) ; C et H (ou I) ; J et K (ou L).

- 2 - En présence du magnésium l'activation est moins forte pour la glycine que pour le véronal. Elle est plus faible pour la sulfamide que pour la glycine.
- 3 - La combinaison véronal + glycine semble inhibitrice : G et A (ou B); J et D (ou E).

La remarque n° 2 nous a conduit à étudier l'influence inhibitrice de la glycine elle-même. Influence classiquement connue pour les phosphatases de l'os et de l'intestin (11).

Nous avons opéré à pH 9,6 avec une suspension leucocytaire de concentration 10×10^6 éléments/ml (sans Cl_2Mg).

Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU N° 7

Tampon : De concentrations variables en glycine, ajusté à pH 9,6

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml

	Concentration en Glycine	P min. libéré (en μg) pour 1×10^6 leucocytes
A	1×10^{-1} M	26,00
B	6×10^{-2} M	32,00
C	2×10^{-2} M	36,00
D	1×10^{-2} M	38,00
E	4×10^{-3} M	43,00
F	2×10^{-3} M	47,00

On voit par ce tableau que, plus la dose de glycine diminue, plus forte est l'activité phosphatasique. La glycine possède donc un pouvoir inhibiteur certain. Cependant, l'étude des activités phosphatasiques à des pH divers avec le tampon véronal devait nous montrer qu'il en était de même avec ce tampon.

TABLEAU N° 8

Tampon : Véronal de concentration et pH variables

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml

pH	P min. libéré (en µg) en présence de Véronal à la concentration de :	
	5×10^{-1} M	5×10^{-2} M
9,10	31,75	43,00
9,20	38,75	56,00
9,30	47,00	61,00
9,45	56,50	67,00
9,55	64,00	71,00
9,80	59,00	68,00

On voit, là aussi, que la concentration en véronal influe sur l'activité enzymatique; pour un même pH la quantité d'orthophosphate libéré est d'autant plus forte que la concentration en véronal est plus faible.

Conclusions : A la suite de ces essais, nous avons finalement décidé d'utiliser de préférence le tampon glycine sans borate (dont la formule a été donné ci-dessus) qui est utilisable aussi en milieu acide (voir plus loin) et de contrôler certaines réactions avec le tampon véronal.

Avec les tampons, tels qu'ils sont employés et en l'absence d'effecteurs, les résultats pour une même suspension sont identiques (voir Tableau n° 6, lignes A et B).

c - *Tampons acides* : Nous avons utilisé, dès le début, le tampon classique "acide acétique-acétate de sodium", dont les qualités sont bien connues. Mais, lors de nos essais avec le tampon universel cité plus haut, nous avons aussi été conduits à étudier ce dernier en milieu acide. Ici, nous citerons l'expérience résumée dans le tableau n° 5 avec les tampons boratés et non boratés, adaptés aux pH acides par l'emploi des solutions suivantes :

Tampon boraté	Sol. de base	40 ml
(glycine 0,16 M)	NaOH N	5 ml
	H ₂ O dist.	qsp 100 ml
Tampon non boraté	Sol. de base	40 ml
(glycine 0,16 M)	NaOH N	4 ml
	H ₂ O dist.	qsp 100 ml

Les résultats sont résumés dans le tableau n° 5, les valeurs étant inscrites sur les lignes E, F, G, H.

Cette fois, l'action inhibitrice du borate se fait peu sentir. L'ion Mg de son côté se montre faiblement activateur.

L'étude comparée des activités phosphatasiques en milieu acétique et en milieu glycine a été faite lors de l'étude des pH optimum. Voir tableaux n° 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, qui correspondent au milieu acétique. Les valeurs trouvées pour les pH 4,5 et 5,2 sont très proches et identiques pour les pH 4,7 à 4,9.

Conclusions : Là encore, nous avons décidé d'utiliser les deux tampons glycine d'une part, acide acétique-acétate de sodium d'autre part, l'un contrôlant l'autre.

5 - LE LIQUIDE DE SUSPENSION

Les leucocytes étant isolés, il s'agissait avant de les mettre en contact avec les réactifs, de libérer leur contenu sans modifier autant que possible les quantités de l'enzyme à doser.

N. FIESSINGER et F. BOYER, en 1936 (35), provoquaient la cytolysse par passages successifs des suspensions leucocytaires dans des bains-marie à 37° et à 0°. D.M. CRAM et R.J. ROSSITER, en 1949 (25) utilisèrent des agents mouillants comme la saponine et les sels biliaires, certains dérivés sulfonés. Mais ils signalèrent à ce sujet l'influence inhibitrice exercée par ces deux dernières séries de corps sur la phosphatase alcaline. Ces faits se voyaient confirmés par R.J. ROSSITER la même année (95).

Dans une intéressante étude, cet auteur établissait que l'activité phosphatasique d'une suspension de polynucléaires est considérablement augmentée lorsqu'on fait intervenir des éléments mouillants (saponine, dérivés sulfonés, sels biliaires). Il démontrait aussi que, seule, la saponine n'avait pas d'action inhibitrice.

Nous avons décidé d'utiliser nous-mêmes la saponine en solution à 2 % dans l'eau physiologique. Le culot leucocytaire lavé était donc repris par cette solution. Une numération était faite aussitôt alors que les cellules étaient encore bien visibles.

Avait lieu ensuite la répartition de la suspension dans les tubes à réaction.

Il nous paraît intéressant de signaler ici que la saponine permet d'avoir une suspension très homogène pour la numération; elle évite, en effet, la formation d'amas leucocytaires.

6 - DETERMINATION DE LA RICHESSE EN CELLULES

Elle était faite selon les techniques classiques. Nous avons utilisé la cellule de MALASSEZ, puis celle de THOMA-BÜRKER. Celle-ci

nous a semblé présenter, dans le cas des exsudats péritonéaux, quelques avantages. La numération a lieu sur de longues bandelettes qui couvrent une large surface. Cette forme spéciale permettant la lecture sur des zones très différentes de la cellule, on peut obtenir des déterminations de la richesse en cellules qui se recoupent. Une première lecture rapide était effectuée sur l'exsudat péritonéal lui-même, après sa filtration sur une gaze. Ce résultat connu et le volume total du liquide précisé, nous reprenions, après lavage, les leucocytes dans une quantité d'eau physiologique saponinée telle que la quantité finale recelait environ 10×10^6 éléments/ml.

Alors était faite une nouvelle numération, ceci afin de déterminer la richesse exacte du milieu en leucocytes.

7 - IMPORTANCE DE LA RICHESSE DU MILIEU EN LEUCOCYTES

L'étude de la cinétique de la réaction montre que la quantité d'orthophosphate libéré cesse d'être directement proportionnelle à la richesse en leucocytes quand plus de 10 % du substrat ont été hydrolysés. On peut donc penser que, si la richesse en cellules est trop forte, la quantité de substrat hydrolysé dépassera 10 % de la quantité totale avant le délai prévu pour l'arrêt de la phase enzymatique. C'est ce que nous avons voulu confirmer dans les expériences suivantes.

TABLEAU N° 9

Tampon : 1 - Véronal M à pH 8,9

2 - Acide acétique-acétate de Na M à pH 4,9

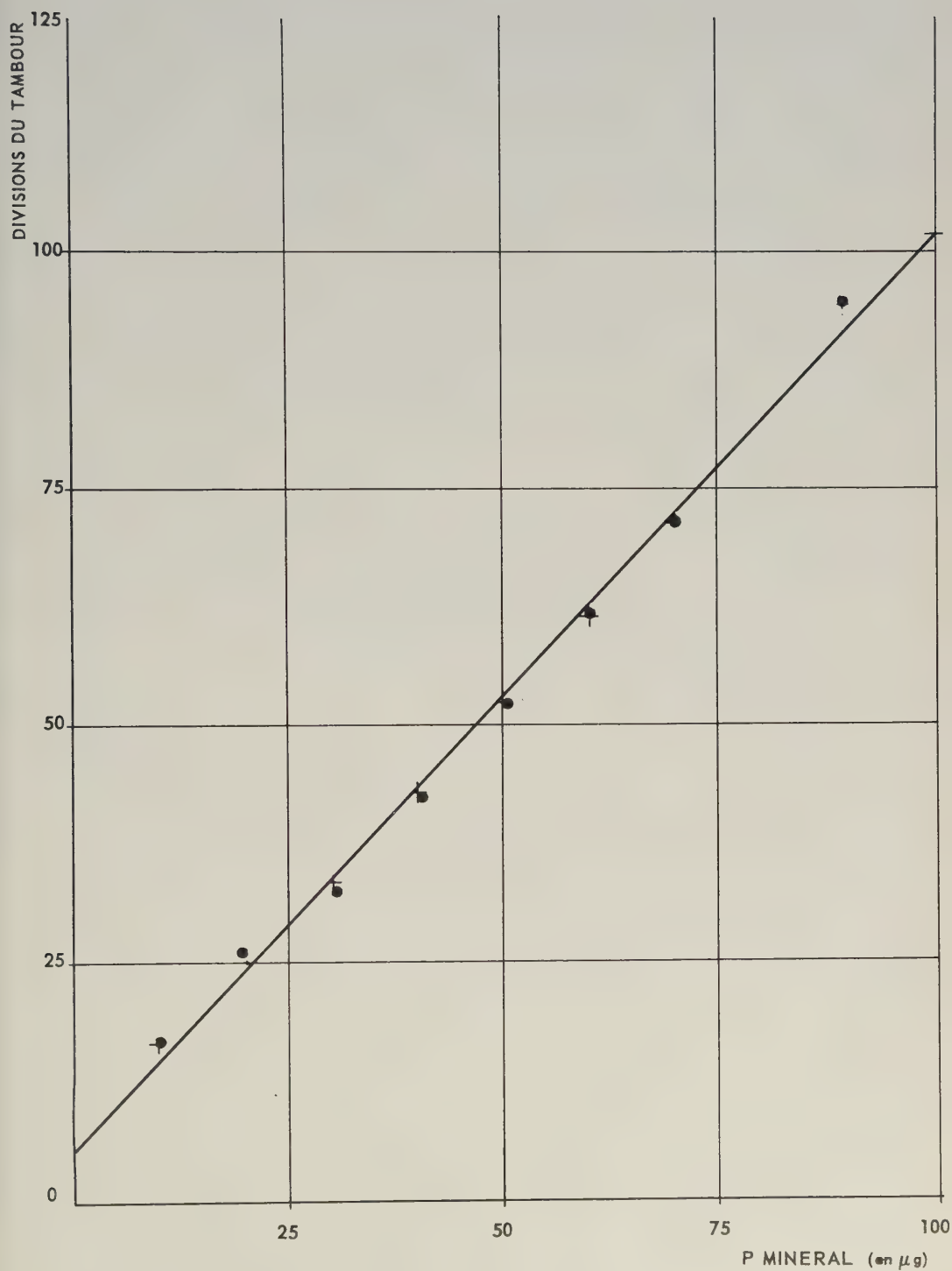
Substrat : Glycérophosphate de Na 3×10^{-2} M

Effecteur : Cl_2Mg 1×10^{-3} M

Leucocytes : Suspensions à concentrations diverses, dans l'eau physiologique saponinée à 2 %, de polynucléaires provenant de 3 cobayes.

pH	Nb de leucocytes introduits $\times 10^6$	P min. libéré (en μg)	% de glycérophosphate hydrolysé	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 polynucléaires
8,90	4,90	225,00	2,42	46,00
	9,80	460,00	4,96	47,00
	14,70	640,00	6,88	43,50
	19,60	895,00	8,62	45,50
4,90	4,90	84,00	0,90	17,15
	9,80	-	-	-
	14,70	254,00	2,73	17,25
	19,60	340,00	3,62	17,30

FIGURE 3



Nous nous sommes finalement arrêtés au chiffre de 10×10^6 éléments par ml. comme nous l'avons indiqué dans le paragraphe touchant au substrat de la réaction (page 36). Un nombre trop élevé de cellules risquerait d'entraîner un ralentissement de l'activité phosphatasique, la quantité d'orthophosphate pouvant alors dépasser 10 % du substrat hydrolysé.

C - DOSAGE DU " PHOSPHORE MINERAL "

Il s'agit, en réalité, du dosage de l'orthophosphate qui est formé au cours de l'hydrolyse enzymatique du glycérophosphate de sodium, mais nous avons préféré exprimer les résultats en quantité de phosphore, d'où le terme adopté de : "phosphore minéral". Nous avons choisi, pour ce dosage, la technique de BRIGGS.

1 - TECHNIQUE DE BRIGGS

Etant données les faibles concentrations en orthophosphates obtenues, nous avons utilisé la technique colorimétrique de BRIGGS, basée sur la réaction céruléo-molybdique : si à une solution d'orthophosphate on ajoute un excès de molybdate d'ammonium et un mélange réducteur formé par un polyphénol (hydroquinone) et du sulfite de sodium, il se produit un complexe phospho-molybdeux-molybdique d'une coloration bleue dont l'intensité est fonction de la quantité d'orthophosphate dosée. Parallèlement à la réaction (effectuée sur une quantité telle que le P à doser ne dépassait pas 100 μg), nous préparions des tubes étalons contenant : 0, 10, 20, 50 et 100 μg de P à doser à partir d'une solution titrée de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$. Après adjonction des réactifs, et un séjour de 1 heure à l'abri de la lumière, nous procédions à la mesure de l'intensité de la coloration bleue au moyen d'un photomètre de Pulfrich (écran S 72). La cuve de compensation était remplie par le liquide préparé dans le tube étalon contenant 0 de P.

Nous étalonnions ainsi, chaque fois, le photomètre, et, par comparaison de la densité optique des solutions à doser et de celles de la gamme étalon, nous déterminions la quantité d'orthophosphate qui y était contenue.

2 - JUSTIFICATION DE CETTE TECHNIQUE

La valeur de cette technique a été vérifiée dans la zone allant de 0 à 100 μg de P, zone que nous avons prise comme limite. Avec des solutions d'orthophosphate telles que 10 ml contiennent des doses de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μg de P., nous avons utilisé la technique en cause de la façon suivante :

Sol. d'orthophosphate	quantité variable qsp. 10
Réact. molybdique	2 ml.
Sol. hydroquinone (1 %)	1 ml.
Sol. sulfite de sodium (20 %)	1 ml.

Après 60 minutes de séjour à l'abri de la lumière, la densité optique de chaque essai était déterminée au photomètre. La cuve de compensation était remplie par de l'eau distillée. Pour chaque essai, 5 mesures étaient faites, et la moyenne de celles-ci calculée.

Les résultats se trouvent reportés sur la figure n° 3.

Chacun sait que la méthode de BRIGGS peut-être considérée comme une méthode classique. On peut constater que, même dans nos conditions opératoires, elle conserve toute sa valeur.

Nous avons répété cette expérience avec les mêmes doses d'orthophosphate mais dissoutes dans des quantités variables d'eau distillée (4, 5, 7, 9, 10 ml); les déterminations étaient faites avec le photomètre Pulfrich d'une part et le photomètre tricellule de Jobin et Yvon (écran 720 m μ) de l'autre.

A la suite de ces essais, nous avons finalement adopté le volume de 10 ml de solution phosphorique parce qu'il nous paraissait offrir le plus de sensibilité.

D - EXPRESSION DES RESULTATS

Tous les résultats ont été exprimés en μg de P minéral libérés pour 1×10^6 éléments figurés.

E - RESUME DE LA TECHNIQUE

1 - PRINCIPE

Dans un premier temps, on fait agir une suspension de leucocytes (10×10^6 éléments/ml environ) sur un substrat de glycérophosphate de sodium tamponné en milieu acide (pH 4,8) ou alcalin (pH 9,8) pendant une heure à 37°.

Dans un second temps, on dose le phosphore minéral libéré.

Pour chaque essai, 6 tubes étaient préparés (les tubes A et C étant faits en double).

TABLEAU N° 10

REACTIFS

Tampon acide : acétique ou glycine à pH 4,7

Tampon alcalin : véronal ou glycine à pH 9,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 6,20 gr pour 100 ml (0,2 M)

Matériel enzymatique : Suspension cellulaire contenant 10×10^6 éléments/ml.

Acide trichloracétique à 20 %.

2 - MODE OPERATOIRE

Premier temps :

REPARTITION	A et A'	B	C et C'	D
Tampon acide pH 4,8	5 ml :	5 ml :	0	0
Tampon alcalin pH 9,7	0	0	5 ml :	5 ml :
Substrat	1 ml :	1 ml :	1 ml :	1 ml :
Eau distillée	1 ml :	2 ml :	1 ml :	2 ml :
Suspension cellulaire	1 ml :	0	1 ml :	0
1 H d'incubation au bain-marie à 37°				
Ac. trichloracétique à 20 %	2 ml :	2 ml :	2 ml :	2 ml :
Agiter et filtrer sur filtres sans cendres.				

Deuxième temps : Dans une série identique de tubes (un tube par filtrat) sont ajoutés :

Filtrat	5 ml.
H ₂ O	5 ml.
Réact. molybdique	2 ml.
Sol. hydroquinone (1 %)	1 ml.
Sol. sulfite de Na crist. (20 %)	1 ml.

Cette réaction colorée est effectuée en même temps sur une gamme étalon de 4 tubes contenant : 0, 25, 50 et 100 µg de P en solution (dans 10 ml d'eau distillée) dans lesquels on a ajouté tour à tour le réactif molybdique et les solutions d'hydroquinone et de sulfite de sodium.

Tous les tubes (essais et gamme) sont alors mis à l'obscurité pendant 30 minutes.

L'intensité colorimétrique est estimée au photocolorimètre tri-cellule de Jobin et Yvon (écran $720\text{ m}\mu$) ou au photocolorimètre Pultrich (long. d'ondes $729\text{ m}\mu$).

Calculs

Pour la gamme : on retranche le tube 0 des tubes 25, 50 et $100\text{ }\mu\text{g}$.
On trace la courbe qui est une droite.

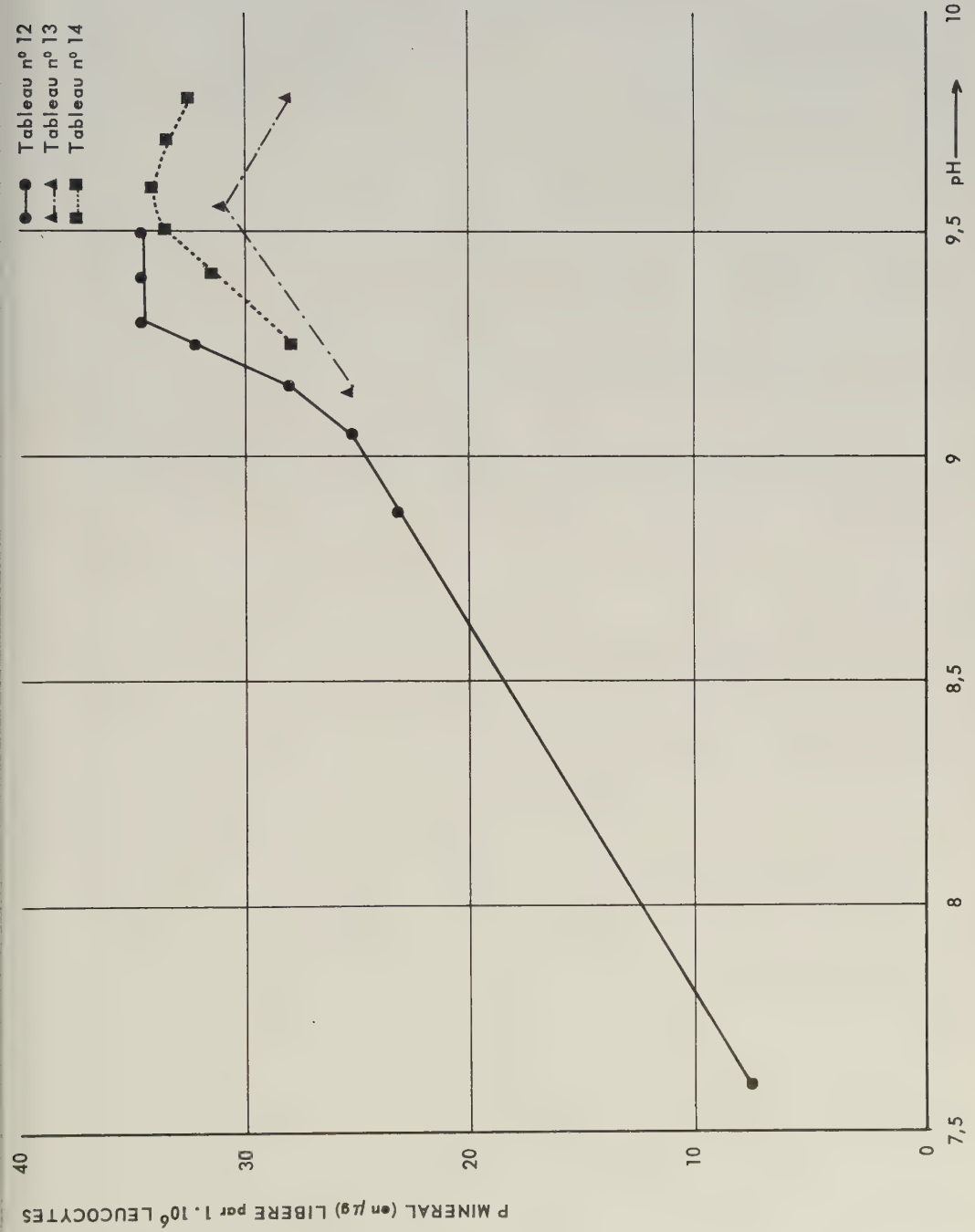
Pour les essais, on retranche les tubes B de A et D de C.

On calcule sur la courbe les valeurs correspondantes de P minéral.

Nota : Les dosages n'ont été considérés comme valables que si les taux de P minéral trouvés dans chacun des deux tubes réactionnels (en milieu acide ou alcalin) ne différaient pas de plus de 10 %. Le résultat donné est la moyenne arithmétique des deux valeurs trouvées.



FIGURE N°4



CHAPITRE III

APPLICATION DE NOTRE TECHNIQUE A L'ETUDE DES POLYNUCLEAIRES INFLAMMATOIRES

La technique étant définitivement établie, nous l'avons utilisée pour étudier certains problèmes intéressant les polynucléaires inflammatoires. I

Tout d'abord, il nous fallait adapter à notre technique la préparation des leucocytes inflammatoires. C'est à ce sujet que sera consacré le premier paragraphe. I

Puis, sera traité la détermination des pH optimum pour les PME des cellules ainsi préparées. I

Ces deux faits acquis, toutes les autres déterminations seront faites dans les conditions opératoires déterminées.

Nous étudierons ensuite :

- *La variation des activités PME acide et alcaline chez les cobayes normaux d'un animal à l'autre.* Nous poserons parallèlement le problème d'un rapport possible entre les richesses en cellules des exsudats péritonéaux et la valeur des PME pour ces cellules isolées. I
- *L'influence de quelques effecteurs possibles des phosphatases.* Effecteurs chimiques tels que : Les phosphates, le magnésium, le zinc, l'acide borique. I Effecteur physique tel que : le froid. I
- *Nous évoquerons ensuite, l'action possible de certains facteurs biologiques tels que :* Les extraits leucocytaires, les extraits d'organes hématopoïétiques, l'avitaminose C. I
- *L'influence, enfin, de la phagocytose.* Après ce paragraphe, un addendum traitera du même sujet, mais avec des cellules blanches du sang circulant. I

Les résultats obtenus dans les deux cas seront ensuite comparés.

A - PREPARATION DES POLYNUCLEAIRES

1 - LES LEUCOCYTES UTILISES

Les recherches ont été effectuées sur des leucocytes provenant d'un exsudat péritonéal aseptique provoqué chez le cobaye. Il s'agissait de cobayes adultes (de 350 à 400 gr.). Une injection intra-péritonéale (de 6 ml. de bouillon nutritif stérile) était pratiquée à 9 heures du matin. Trois heures plus tard, 4 ml. de bouillon stérile étaient à nouveau injectés dans les mêmes conditions opératoires. Deux heures plus tard, soit 5 heures en moyenne après la première injection, on ponctionnait la cavité péritonéale. Pour cela, on utilisait des pipettes Pasteur de 60 à 80 cm de longueur (le liquide d'exsudat monte rapidement dans la pipette). On recueillait ainsi, par animal, de 15 à 25 ml. d'exsudat. On pouvait aussi sacrifier l'animal et l'autopsier. Le liquide, où baignait l'intestin, était recueilli.

2 - CARACTERE DES EXSUDATS

Les liquides obtenus de la sorte sont troubles, le trouble étant dû à la présence de cellules. Lorsque toutes les opérations avaient été conduites avec succès, ils ne contenaient que peu d'hématies. Tout exsudat sanglant était rejeté. Il arrivait que, dans le liquide obtenu, flottent des agglomérats de leucocytes, assez gros parfois pour être visibles à l'œil nu. Pour les éliminer, nous filtrions les préparations sur plusieurs couches de gaze hydrophile. Les liquides d'exsudats contiennent des quantités variables d'éléments figurés de 10×10^6 à 25×10^6 leucocytes/ml., essentiellement des polynucléaires neutrophiles (90 à 92 %), et $0,1 \times 10^6$ à $0,8 \times 10^6$ hématies/ml.

3 - PREPARATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE

Le liquide où les leucocytes sont en suspension possède une activité phosphatasique propre. Nous avons été obligés de le séparer des cellules. Après une première centrifugation (2 minutes à 1000 tours/minute), un culot bien séparé était recueilli. Ce culot était repris par 2 à 3 gouttes, puis 1 ml., puis 2 fois 10 ml. d'eau physiologique, ceci afin d'assurer une parfaite homogénéité de la suspension cellulaire. Après une seconde centrifugation (identique à la première), une nouvelle décantation et une nouvelle remise en suspension des cellules, on ajustait à un volume déterminé en fonction du nombre des leucocytes contenus dans l'exsudat avec de l'eau physiologique saponinée (toutes les remises en suspension étaient pratiquées à l'aide d'un agitateur fin et avec beaucoup de délicatesse). Toutes ces opérations conduisent finalement à une suspension homogène de leucocytes lavés.

4 - JUSTIFICATION DE CE PROCEDE OPERATOIRE

Nous avons étudié les PME du liquide exsudatif et des liquides de lavage successifs. Ces dosages ont été effectués en milieu acide

à pH 5,2 et en milieu alcalin à pH 9,2 suivant les procédés classiques utilisés jusqu'ici. '.

Les résultats ont été les suivants :

TABLEAU N° 11

	P min. libéré (en μ g) pour 1 ml. de liquide exempt de leucocytes	
	pH 5,2	pH 9,2
Liquide exsudatif	230,00	1300,00
Liquide de 1er lavage	35,00	120,00
Liquide de 2ème lavage	8,00	25,00
Liquide de 3ème lavage	10,00	30,00

Il apparaît par là qu'un seul lavage suffit à éliminer le liquide d'exsudat, la faible activité phosphatasique résiduelle provient sans doute du liquide intracellulaire extravasé par altération des cellules au cours des manipulations. Aussi nous a-t-il semblé préférable de ne pas multiplier ces lavages; ils risqueraient d'éliminer une partie des phosphatases intraleucocytaires par rupture des cellules.

B - DETERMINATION DES pH OPTIMUM

On sait que l'activité des PME sériques se manifeste dans deux zones optimum, l'une en milieu alcalin, l'autre en milieu acide. Nous nous sommes efforcés, dans une série d'essais, de préciser les pH optimum d'action des PME intraleucocytaires en milieu acide et en milieu alcalin. '.

1 - ZONE ALCALINE

Des essais ont été pratiqués avec trois types de tampons glycine, véronal, sulfamide. (voir ci-dessus l'étude consacrée à ces milieux tamponnés). '.

Première série d'essai.

TABLEAU N° 12

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH N en quantités variables

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml., provenant de 5 cobayes normaux.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes
1	7,60	6,90
2	8,90	23,50
3	9,05	25,50
4	9,15	28,00
5	9,25	32,50
6	9,30	34,50
7	9,40	34,50
8	9,50	34,50

L'activité phosphatasique augmente progressivement. Nous avons alors pensé à examiner 3 pH dans la zone de pH 9 en présence et en l'absence de magnésium.

Deuxième série d'essais :

TABLEAU N° 13

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH en quantités variables

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : 2 groupes de tubes : 1) sans effecteur

2) avec effecteur Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml., provenant de 5 cobayes normaux.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μ g) pour 1×10^6 leucocytes	
		sans Cl_2Mg	avec Cl_2Mg
1	9,15	25,75	30,00
2	9,55	31,00	37,00
3	9,80	28,00	35,50

Troisième série d'essais :

TABLEAU N° 14

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH en quantités variables

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : 8×10^6 éléments/ml. provenant d'un seul cobaye normal.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) pour 1×10^6 leucocytes
1	9,25	29,00
2	9,40	31,60
3	9,50	33,50
4	9,60	34,00
5	9,70	33,50
6	9,80	32,50

Troisième série d'essais :

TABLEAU N° 15

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH en quantités variables

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : $5,2 \times 10^6$ éléments/ml. provenant d'un seul cobaye normal.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) pour 1×10^6 leucocytes
1	9,65	43,50
2	9,85	42,50
3	10,10	28,00
4	10,30	13,80

Quatrième série d'essais :

TABLEAU N° 16

Tampon alcalin : Véronal sodique 0,3 M

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : 2 groupes de tubes : 1) sans effecteur :

2) avec Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml. provenant de 3 cobayes normaux.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes	
		sans Cl_2Mg	avec Cl_2Mg
1	9,10	31,75	-
2	9,20	38,75	-
3	9,30	47,00	55,50
4	9,45	56,50	-
5	9,65	64,00	80,00
6	9,90	59,00	-

Cinquième série d'essais :

TABLEAU N° 17

Tampon alcalin : à base de sulfamide

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : 2 groupes de tubes : 1) sans Cl_2Mg

2) avec Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml. provenant de 5 cobayes normaux.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes	
		sans Cl_2Mg	avec Cl_2Mg
1	8,10	7,75	8,00
2	9,25	20,50	22,00
3	9,45	21,00	24,50
4	9,75	19,75	20,75
5	9,95	18,00	17,75
6	10,30	12,50	12,75

Les résultats des tableaux 12, 13 et 14 ont servi à établir les courbes de la figure n° 4.

Conclusions : Tous les essais pratiqués, quels que soient les tampons utilisés, ont montré un optimum d'action dans la zone 9,5 à 9,7, un large plateau de valeurs proches s'étalant des pH 9,3 à 9,8. La présence de Mg exalte l'activité PME alcaline.

2 - ZONE ACIDE

Des essais ont été pratiqués avec les tampons glycine et acide acétique-acétate de sodium.

Première série d'essais :

TABLEAU N° 18

Tampon : Glycine 0,1 M + SO_4H_2 (N) ou NaOH (N)

Substrat : Glycérophosphate de Na : 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes
1	1,55	0,20
2	2,40	0,50
3	2,70	0,50
4	3,10	0,30
5	3,45	2,00
6	3,70	7,50
7	4,20	13,20
8	4,60	16,20
9	4,80	17,60
10	5,00	18,70

Répétant ce que nous avons fait en milieu alcalin, nous avons procédé à l'étude de la zone proche de pH 5 avec deux tampons, avec et sans activateurs.

Deuxième série d'essais :

TABLEAU N° 19

Tampon : Glycine 0,1 M + NaOH N

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant ou Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml. provenant de 3 cobayes normaux.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) pour 1×10^6 leucocytes	
		sans Cl_2Mg	avec Cl_2Mg
1	4,35	9,00	9,00
2	5,10	12,40	12,20
3	5,30	10,20	10,20

Troisième série d'essais :

TABLEAU N° 20

Tampon : Acide acétique-acétate de Na M à doses variables

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant ou Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml. (identiques à ceux du tableau n° 8)

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) pour 1×10^6 leucocytes	
		sans Cl_2Mg	avec Cl_2Mg
1	4,35	13,00	13,00
2	5,10	12,20	12,00
3	5,30	11,20	11,20

Quatrième série d'essais :

TABLEAU N° 21

Tampon : Glycine 0,1 M + NaOH N

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

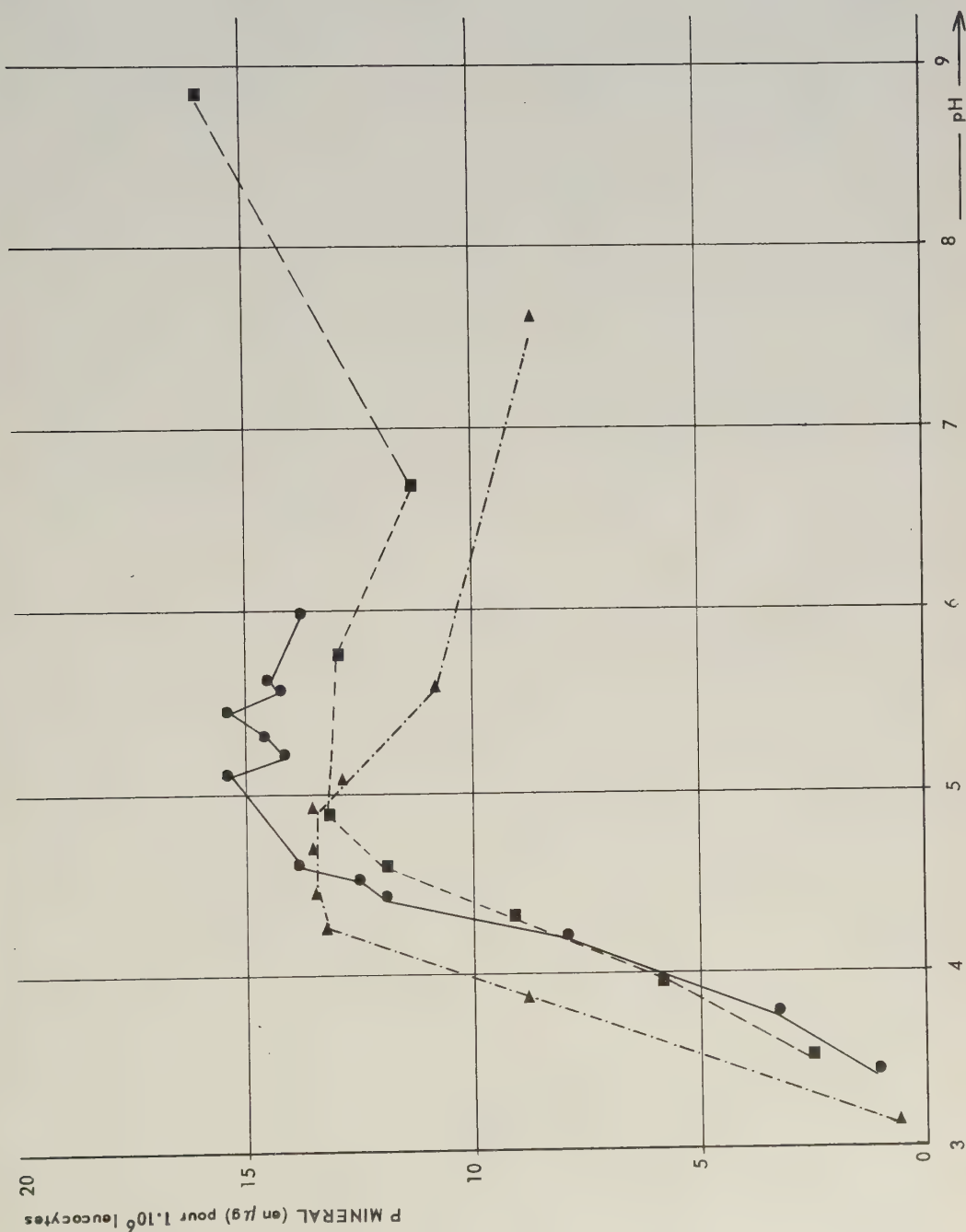
Effecteur : Néant

Leucocytes : 8×10^6 éléments/ml.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) pour 1×10^6 leucocytes
1	4,75	11,20
2	5,00	12,90
3	5,10	13,45
4	5,25	13,85
5	5,40	14,00
6	5,65	13,75

FIGURE 4 bis

- Tableau 22
- Tableau 23
- ▲---▲ Tableau 24



Cinquième série d'essais :

TABLEAU N° 22

Tampon : Glycine 0,1 M + NaOH N

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : $5,2 \times 10^6$ éléments/ml.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μ g) pour 1×10^6 leucocytes
1	3,42	1,15
2	3,75	3,40
3	4,20	8,20
4	4,40	11,90
5	4,50	12,50
6	4,60	13,70
7	5,10	14,90
8	5,20	14,20
9	5,25	14,30
10	5,30	14,50
11	5,45	15,30
12	5,55	14,30
13	5,60	14,40
14	5,95	13,80

Sixième série d'essais :

TABLEAU N° 23

Tampon : Glycine 0,1 M + SO_4H_2 N ou NaOH N

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : $9,3 \times 10^6$ éléments/ml.

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μ g) pour 1×10^6 leucocytes
1	3,50	2,50
2	3,95	5,80
3	4,25	8,90
4	4,60	12,10
5	4,90	13,30
6	5,25	13,10
7	5,75	13,00
8	6,65	11,50
9	8,75	16,00

Septième série d'essais :

TABLEAU N° 24

Tampon : Acide acétique-acétate de Na M

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : $9,3 \times 10^6$ éléments/ml. (identiques à ceux du tableau n° 23).

N° des essais	pH obtenus	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes
1	3,20	0,60
2	3,95	9,40
3	4,25	13,00
4	4,50	13,50
5	4,70	13,50
6	4,90	13,50
7	5,10	13,00
8	5,60	11,00
9	7,50	8,50

Les résultats des tableaux n° 22, 23, 24 ont servi à établir les courbes de la figure n° 4 bis. †

Conclusions : Les valeurs optimum des pH en milieu acide forment un plateau dont les limites varient quelque peu en fonction du tampon utilisé.

- 4,5 à 4,9 pour le tampon acétique,
- 4,8 à 5,7 pour le tampon glycine. †

Dans la zone moyenne (4,8 à 5), les valeurs sont identiques avec les deux tampons (voir tableaux 23 et 24). Le magnésium ne semble pas être un activateur de la PME acide. †

C - RICHESSE EN PME DES LEUCOCYTES INFLAMMATOIRES PROVENANT D'ANIMAUX NORMAUX

Deux séries de déterminations ont été faites qui concernaient des leucocytes provenant de deux groupes d'animaux différents.

Dans le premier groupe (tableau n° 25), les cobayes étaient alimentés exclusivement avec du fourrage sec et du grain (alimentation hivernale classique). Le second groupe de cobayes avait un régime classique de printemps qui comporte des aliments frais (tableau n° 26). Les résultats sont consignés dans les deux tableaux ci-dessous.

TABLEAU N° 25

(série d'hiver)

Tampon alcalin : Véronal 0,1 M ajusté à pH 9,8

Tampon acide : Acide acétique-acétate de Na M à pH 4,8

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : $\text{Cl}_2\text{Mg } 2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$

Leucocytes : Nombre variable selon l'exsudat examiné, mais suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

N° des cobayes	Nb. de leucocytes ($\times 10^6$) par ml. d'exsudat péritonéal	P minéral libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes	
		Pour la PME alcaline	Pour la PME acide
1	11,50	65,50	13
2	22,20	58,50	12,10
3	18,90	56	11
4	13,00	57	16,50
5	15,50	84	14,50
6	8,40	83	13
7	17,00	76,50	19
8	10,30	80,50	18
9	2,00	162,50	24,50
10	23,00	66	13,50
11	13,90	72	15
12	9,90	85	23,50
		moyenne : 78,8 sigma : $\pm 30,1$	moyenne : 16,1 sigma : $\pm 4,35$

TABLEAU N° 26

(série de printemps)

Tampon alcalin : Véronal 0,1 M ajusté à pH 9,8

Tampon acide : Acide acétique-acétate de Na M à pH 4,8

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M

Leucocytes : Nombre variable selon l'exsudat examiné, mais suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

N° des cobayes	Nb. de leucocytes ($\times 10^6$ par ml. d'exsudat péritonéal)	P minéral libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes	
		Pour la PME alcaline	Pour la PME acide
13	9,3	74,50	10,10
14	17	51,00	12,40
15	18,5	64,00	16,50
16	13,6	98,00	26,00
17	16,7	73,50	18,50
18	21,9	61,50	28,50
19	19,8	55,50	15,70
20	22,1	51,00	14,60
21	17,75	37,00	13,50
22	25,6	63,50	17,00
23	9,5	79,00	13,10
24	13,75	52,00	14,00
25	10,25	54,50	14,00
26	3,6	61,00	14,70
		moyenne : 62,6 sigma : $\pm 15,05$	moyenne : 16,3 sigma : $\pm 5,10$

Conclusions :

Trois faits principaux sont à noter ici :

1 - La grande diversité des valeurs des PME acide et alcaline d'un animal à l'autre.

2 - L'influence peu sensible du régime sur la richesse en PME acide alcaline. Si on calcule les rapports critiques (coefficient de St. Fisher) on obtient les valeurs de 2 pour les PME alcalines et 0,108 pour les PME acides, avec un degré de liberté de 24. Pour être significatives, les

FIGURE 5.

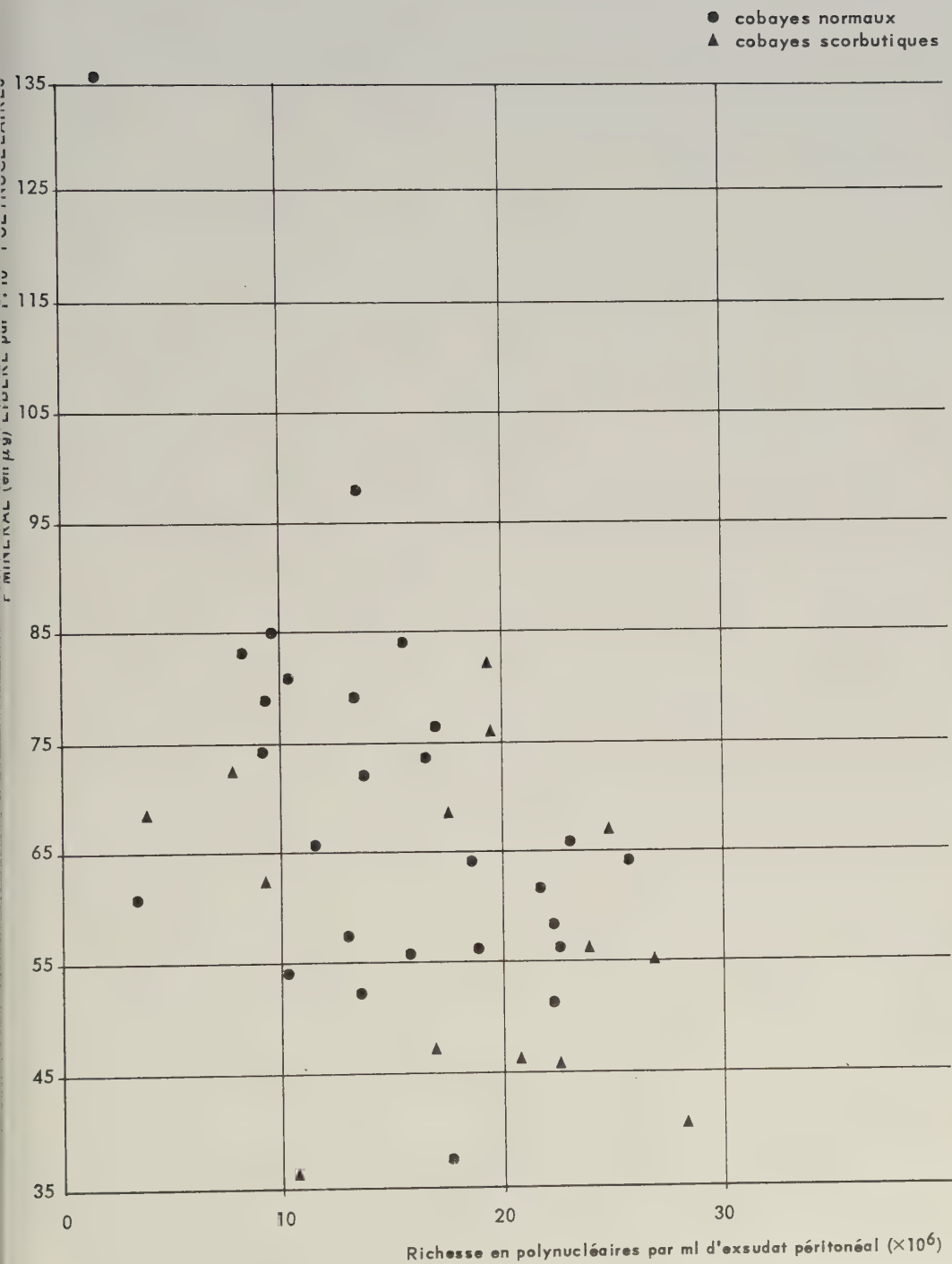
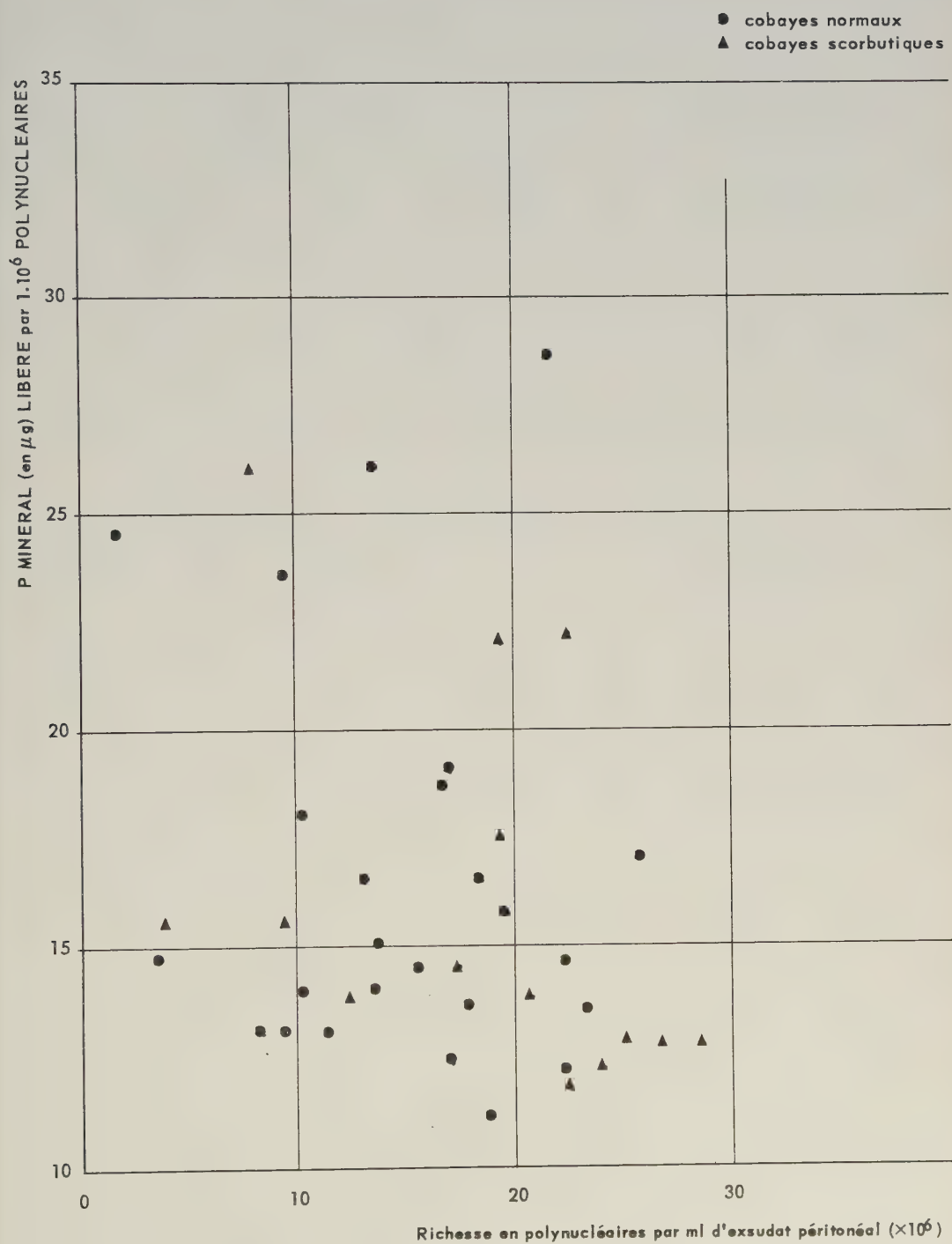


FIGURE 6



valeurs de ces rapports doivent être supérieures à 2,064 pour P 0,5 et 2,797 pour P 0,1.

Les différences entre les séries d'hiver et de printemps ne sont donc pas significatives.

3 - L'absence de relation entre la richesse des exsudats en polynucléaires et les activités PME de ces cellules : Nous avons constaté la valeur très forte de la PME alcaline chez le cobaye n° 9 dont l'exsudat péritonéal se caractérisait par sa faible teneur en cellules. Ce fait nous avait conduit à penser à un rapport possible entre la richesse des exsudats et les valeurs des PME. L'examen des figures n° 5 et 6 montre cependant que les aires de répartition sont sans signification. Aucune relation valable ne peut-être établie entre ces deux données.

D - CONTRIBUTION A L'ETUDE DES CARACTERES DE CES PME

1 - ETUDE DE L'ACTION DE DIVERS EFFECTEURS CHIMIQUES

En abordant ce chapitre de nos recherches, notre but n'était pas d'étudier le mode d'action de certains effecteurs. Ainsi que l'ont rappelé J. ROCHE, J. COURTOIS et NGUYEN-VAN-THOAI (24, 94 bis), l'étude de l'action d'effecteurs variés sur les phosphatases, n'est valable qu'après purification de l'enzyme. Notre propos était de rechercher les conditions les meilleures qui permettaient de mettre en évidence les faibles activités enzymatiques que nous mettions en oeuvre dans notre technique. La recherche d'activateurs, la détermination de leurs concentrations optimum, l'interaction entre effecteurs et solutions tampons devaient donc être abordées, mais aussi l'influence des catabolites de la réaction ne devait pas être négligée. D'où l'étude de l'action des phosphates, du magnésium, du zinc et des borates.

a) Action des phosphates :

Deux séries d'essais préliminaires nous ont permis d'observer l'action de l'ion PO_4H^- sur les PME alcaline et acide.

Première série d'essais : Pour chaque solution tampon essayée, 18 tubes étaient préparés, qui contenaient chacun :

Solution tampon	5 ml.:
Sol. de glycérophosphate de Na 0,2 M	1 ml.:
Eau distillée	1 ml.:

Chacun de ces tubes contenait donc 6,200 μg de P organique hydrolysable. La moitié des tubes recevait, au temps 0, 1 ml. de suspension leucocytaire, l'autre moitié, 1 ml. d'eau saponinée (témoins). Les tubes étaient maintenus au bain-marie à 37° et retirés de 30 minutes en 30 minutes dans chaque groupe, à raison d'un tube "essai" et d'un tube "témoin". Chaque tube, dès sa sortie du bain-marie, recevait 2 ml. de solution d'acide trichloracétique à 20 %.

Les résultats des dosages pour chacune des quatre solutions sont rapportés dans le tableau n° 2 (voir ci-dessus page 34). Les courbes portées sur la figure n° 7 résument ces tableaux.

Deuxième série d'essais : Même protocole opératoire, mais la concentration du substrat était différente. Pour la PME alcaline, la solution de glycérophosphate de sodium était 0,05 M (donc 1550 μg de P hydrolysable par tube). Pour la PME acide, la solution était 0,025 M (soit 775 μg de P hydrolysable).

Les résultats sont consignés dans le tableau n° 1 et rapportés sur les figures 8 (PME alcaline) et 9 (PME acide).

Ces deux séries d'essais montrent que la quantité de glycérophosphate hydrolysé augmente proportionnellement à la durée de l'incubation, tant que cette quantité ne dépasse pas un certain pourcentage qu'on peut établir à environ 10 %. Quand plus de 10 % du substrat ont été hydrolysés, la quantité de phosphate libéré n'augmente plus d'une manière constante. Un ralentissement de plus en plus important est alors observé.

Pour prouver que c'était l'orthophosphate qui était en cause, nous avons refait deux séries de mesures, en milieu alcalin, avec un substrat suffisamment riche pour ne pas atteindre l'hydrolyse à 10 %, mais contenant une solution de phosphate monopotassique. Les résultats de ces troisième et quatrième séries de dosages sont rapportés dans les tableaux ci-dessous.

Troisième série d'essais :

TABLEAU N° 27

Tampon alcalin : 1) Véronal sodique 0,1 M à pH 9,45
2) Glycine 0,1 M à pH 9,50

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M (la quantité de P contenue dans le substrat = 6.200 μg)

Effecteur : P_2O_5 introduit sous forme de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$

Leucocytes : $10,2 \times 10^6$ éléments/ml. provenant de 3 cobayes normaux.

Quantité en μg de P introduite	% de P par rapport au substrat	Tampon véronal		Tampon glycine	
		pH obtenu	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes	pH obtenu	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes
0	0	9,45	35,00	9,50	34,00
10	0,16	9,45	33,50	9,50	32,50
100	1,6	9,40	33,00	9,50	32,25
1000	16	9,45	25,00	9,45	29,50

FIGURE 7

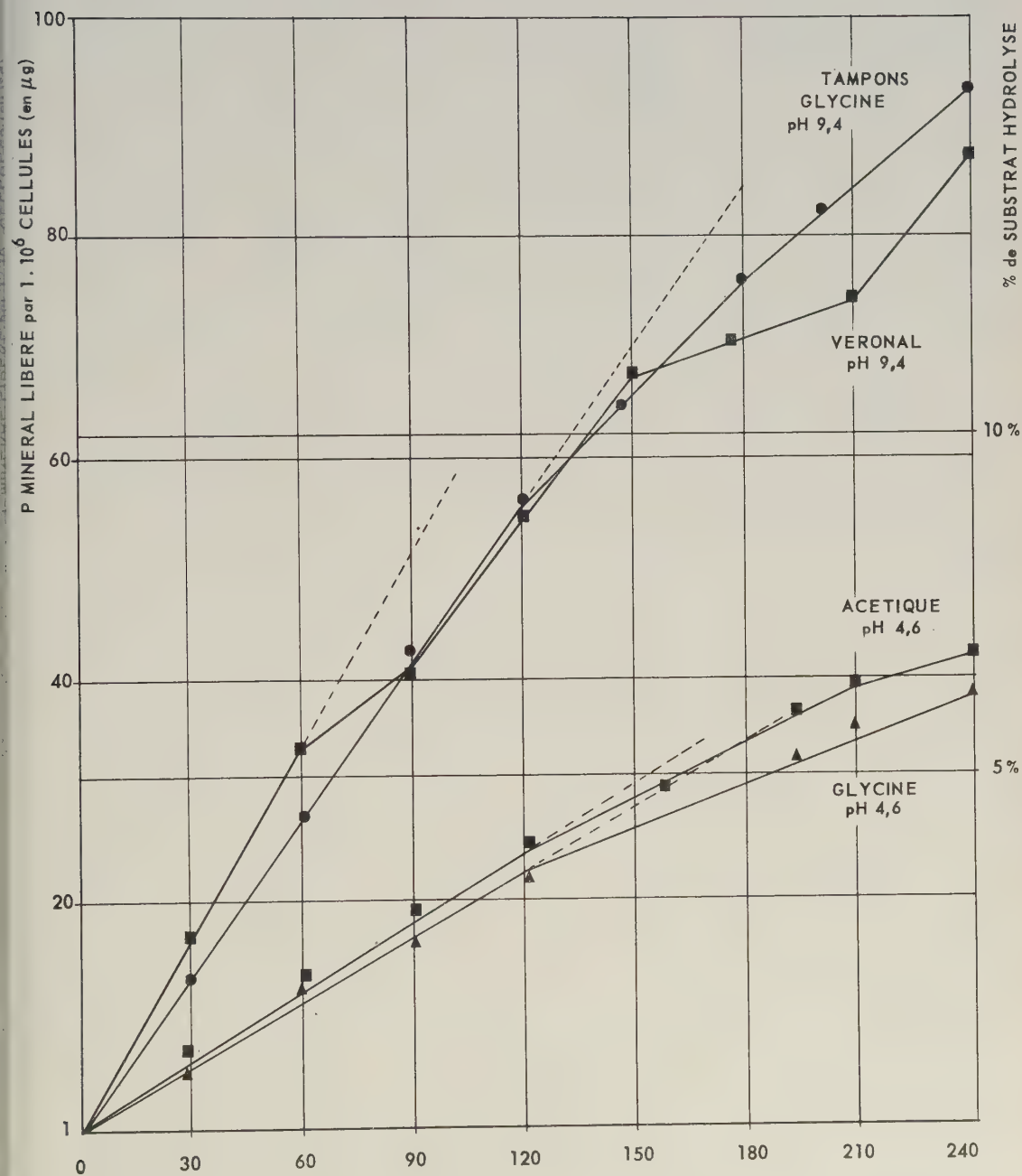


FIGURE 8

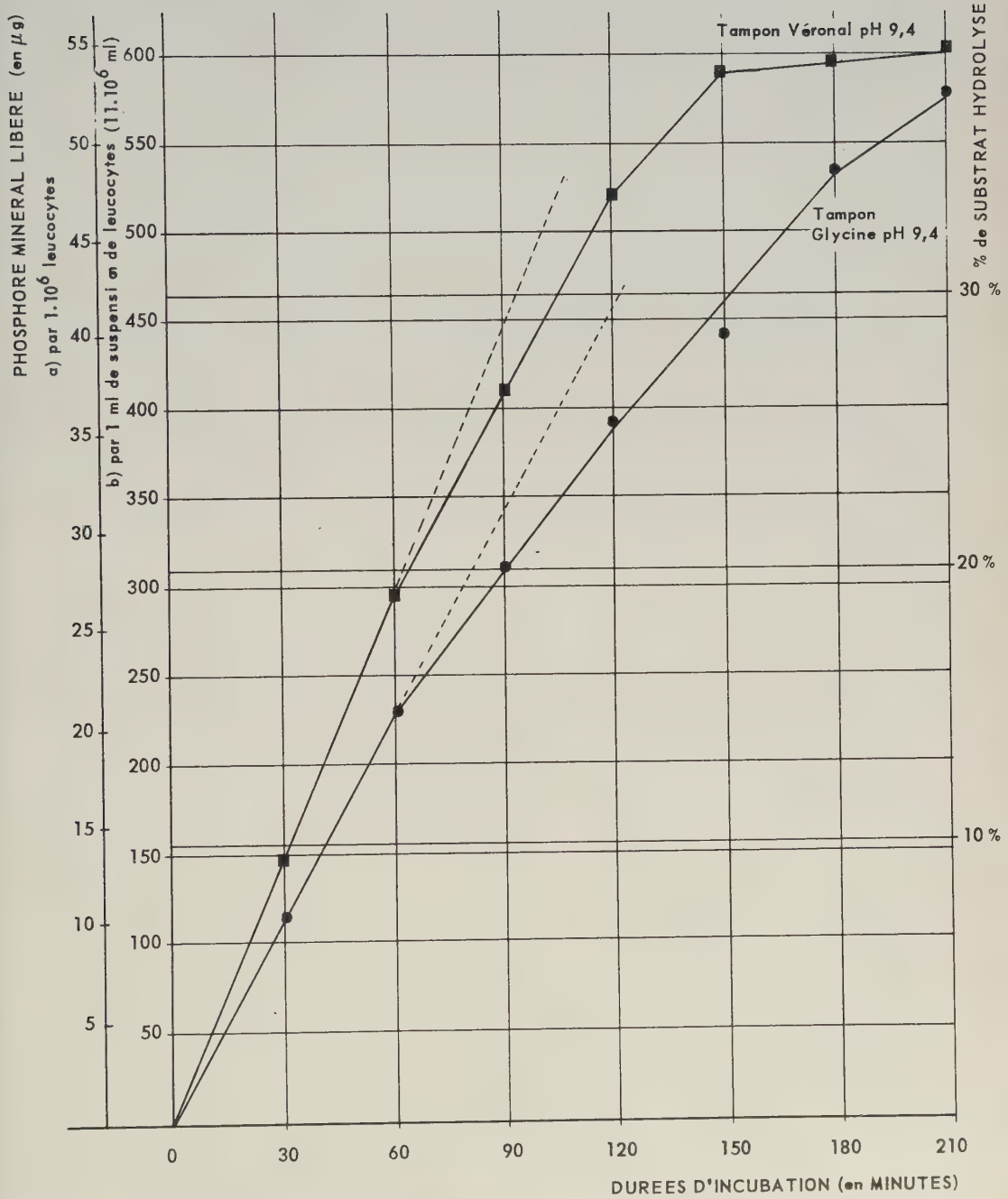


FIGURE 9

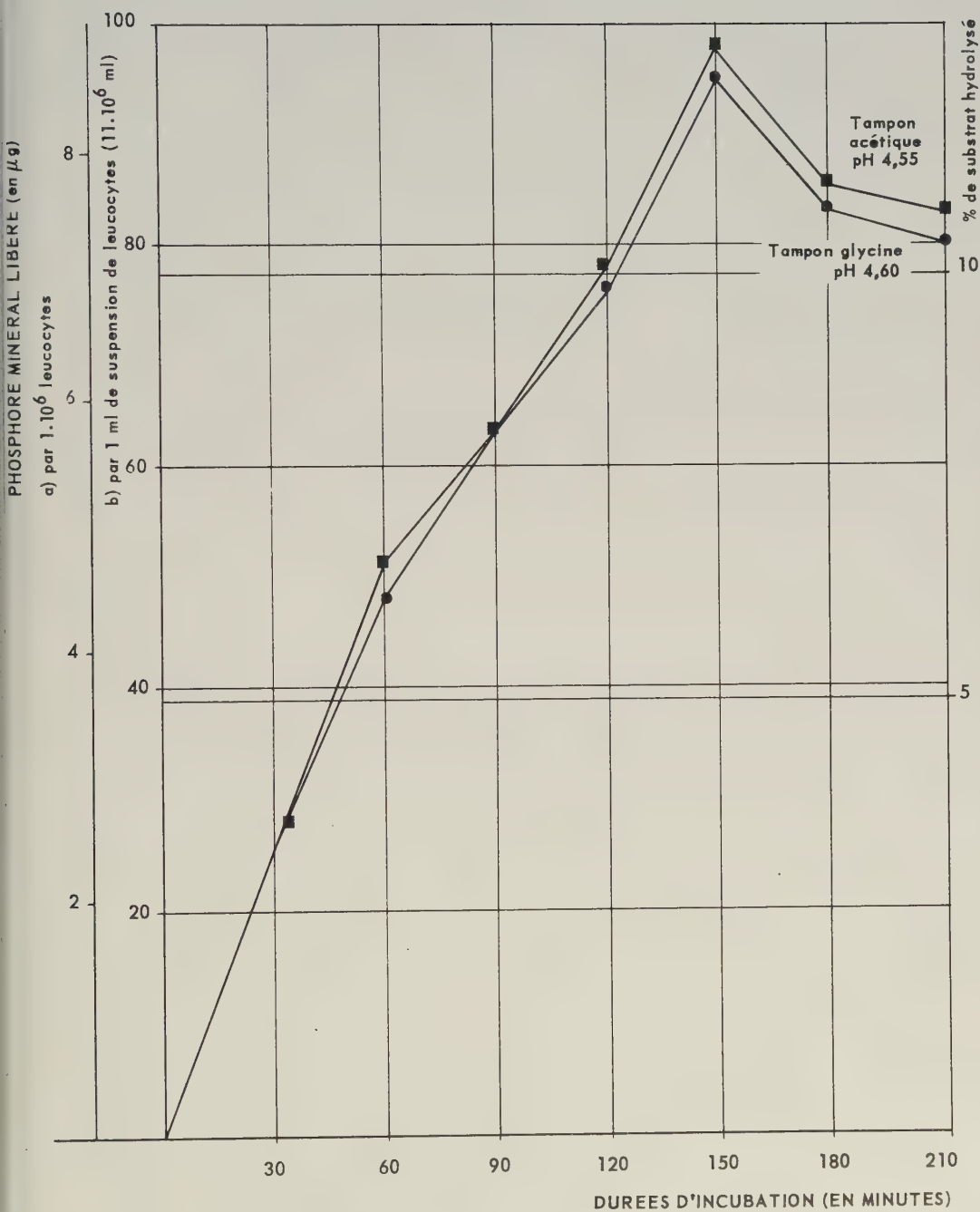


FIGURE 10

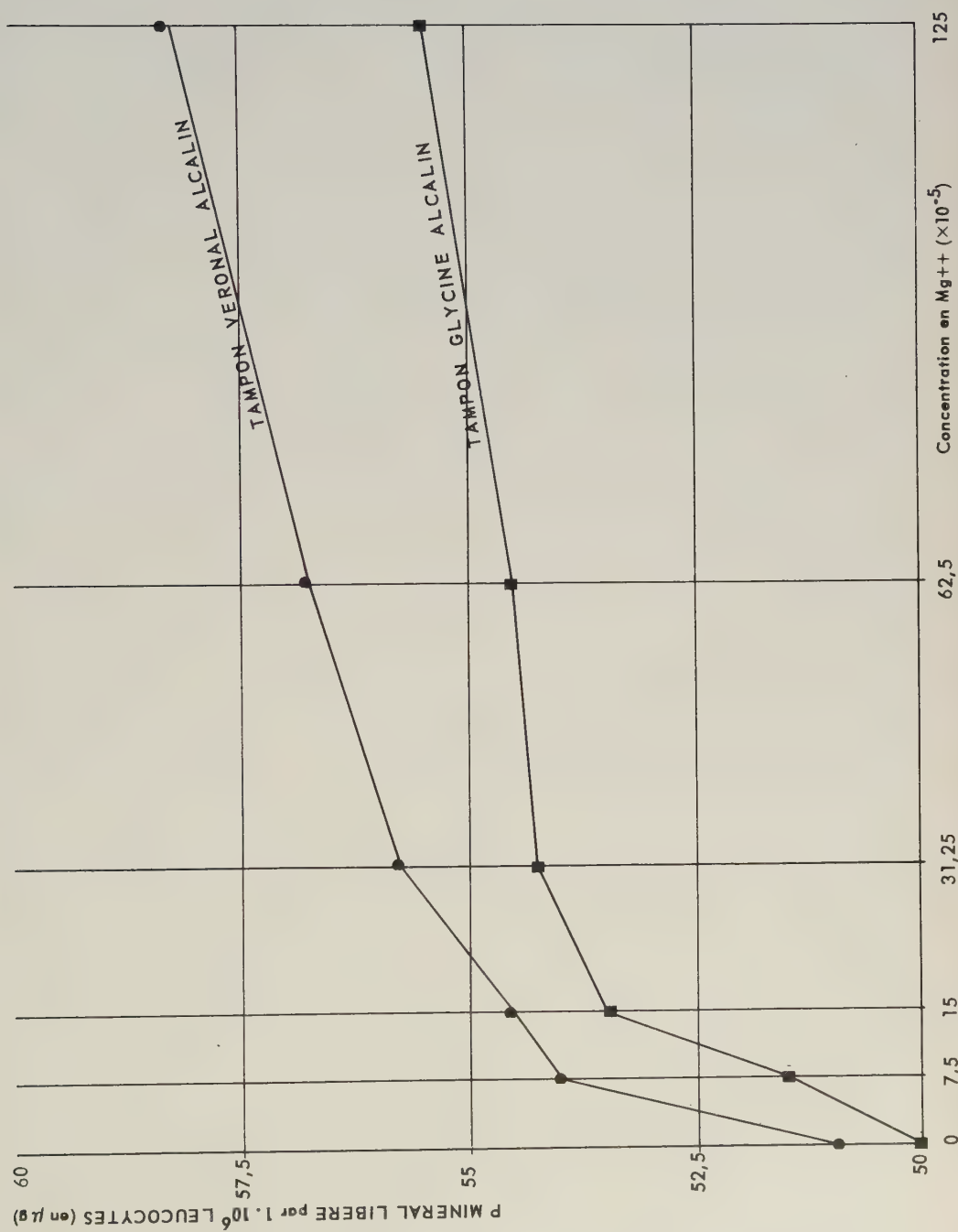
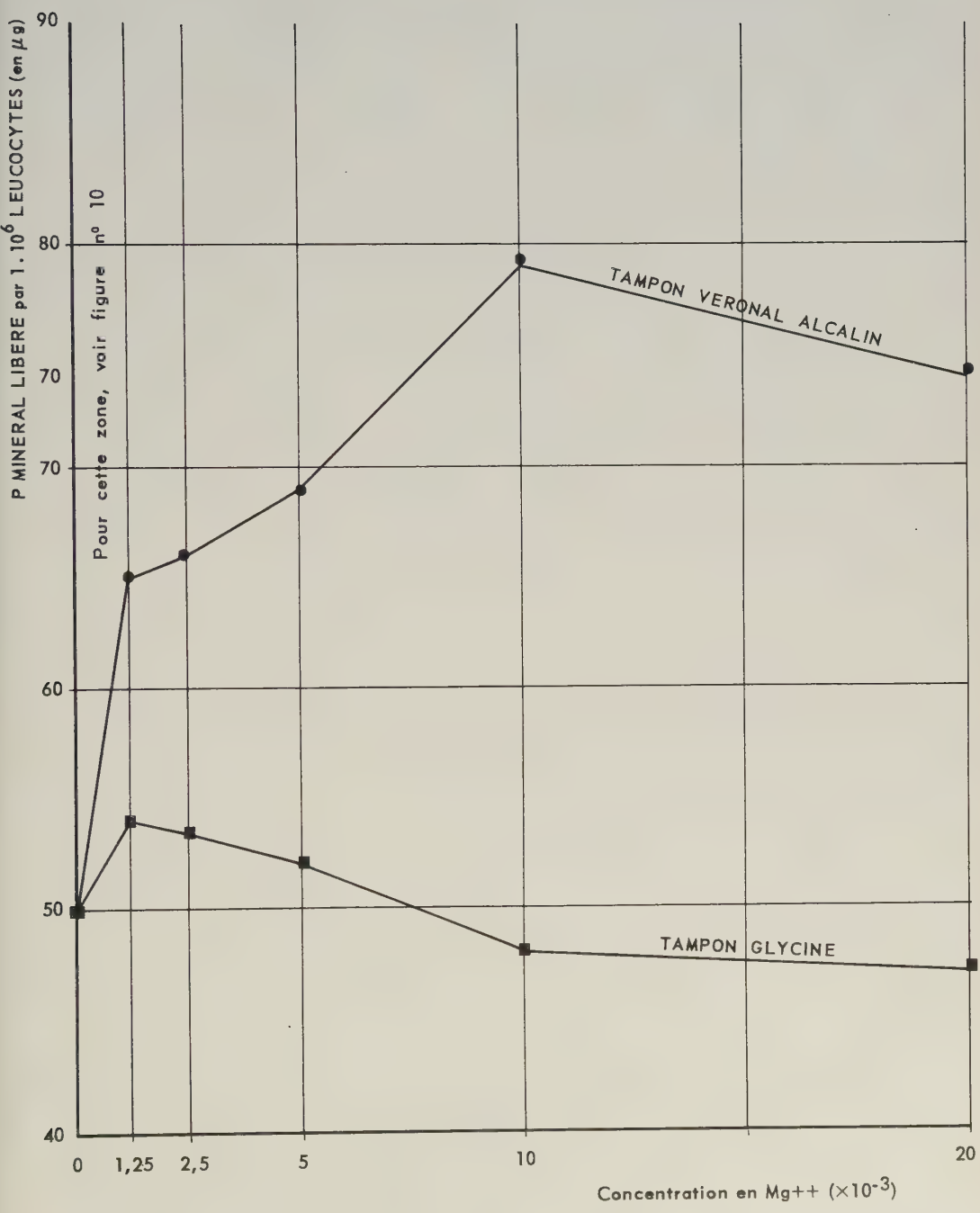


FIGURE 11



Quatrième série d'essais :

TABLEAU N° 28

Tampon alcalin : 1) Véronal : sodique 0,1 M à pH 9,45
2) Glycine 0,1 M à pH 9,50

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M (la quantité de P contenue dans le substrat = 6.200 μ g)

Effecteur : P_2O_5 introduit sous forme de PO_4H_2K

Leucocytes : 10×10^6 éléments/ml. provenant de 5 cobayes normaux.

Quantité en μ g de P introduite	% de P par rapport au substrat	Tampon véronal		Tampon glycine	
		pH obtenu	P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes	pH obtenu	P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes
0	0	9,30	34,00	9,30	33,00
100	1,6	9,30	29,50	9,30	30,25
250	4	9,30	29,50	9,30	28,50
500	8	9,30	28,00	9,30	26,00
750	12	9,30	26,00	9,30	25,00
1000	16	9,30	21,00	9,30	24,00

Conclusions : Le phosphore minéral libéré a une action inhibitrice sur la réaction enzymatique, et, celle-ci est fonction de sa quantité dans le milieu où cette réaction se produit. Elle devient sensible lorsque plus de 10 % du substrat sont hydrolysés.

C'est la confirmation d'un fait classique en enzymologie : les produits d'hydrolyse enzymatique exercent un effet inhibiteur sur l'enzyme.

b) Etude de l'influence du Magnésium sur la PME alcaline.

Le magnésium est classiquement considéré comme activateur des PME alcalines (22, 24, 94 bis). Ce fait a été confirmé pour les leucocytes (25, 129). Les résultats rapportés dans les tableaux n° 5 et 6 sont en accord avec ce fait. Toutefois, l'influence du tampon sur l'importance de l'activation paraît certaine ; ainsi, la comparaison des résultats indiqués sur les tableaux précités montre que la p-amino-benzène-sulfamide rend presque insensible l'activation par le Magnésium, alors que celui-ci reste un effecteur positif important avec le tampon glycine ou le tampon véronal.

Nous nous sommes alors demandé s'il y avait une relation entre la richesse du substrat en Mg et l'effet activateur de cet effecteur.

Deux séries de mesures ont été pratiquées avec des concentrations variables en Mg, et pour chaque série, avec les tampons glycine et véronal (pH 9,6). Les résultats sont rapportés sur les figures n° 10 (concentration en Mg de 0 à $1,25 \times 10^{-3}$ M) et n° 11 (concentration en Mg de $1,25$ à 20×10^{-3} M).

Conclusions : La PME alcaline des polynucléaires inflammatoires est sensible à l'effet activateur du magnésium. Toutefois, au-delà d'une certaine concentration, cet effet cesse, et au contraire, une inhibition relative de l'activité enzymatique s'installe. (A noter également que l'activation en cause n'est pas identique en ses effets, selon la solution tampon employée. L'effet est plus sensible avec le tampon véronal qu'avec le tampon glycine. L'inversion de ce pouvoir activateur du magnésium apparaît pour des concentrations moins élevées en magnésium lorsqu'on utilise le tampon glycine.)

c) Effet d'un sel de zinc sur la PME alcaline

L'action des sels de zinc sur la phosphomonoestérase alcaline est très variable (94 bis). Elle dépend du tissu dont est issue la PME alcaline étudiée. Mais, aussi, pour une même phosphatase, de son degré de pureté. Certaines phosphatases sont activées par de très faibles doses de zinc puis inhibées lorsque la richesse en zinc s'élève. Il nous a donc semblé intéressant de rechercher, si, dans nos conditions opératoires, un tel phénomène se produisait, ce qui devait permettre d'utiliser un activateur à de très faibles doses.

Nos expériences sont résumées dans les tableaux 29 et 30.

TABLEAU N° 29

Tampon : 1) Véronal sodique 0,1 M à pH 9,4

2) Glycine 0,1 M + NaOH N à pH 9,4

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Zn introduit sous forme d'acétate à doses variables

Leucocytes : $4,2 \times 10^6$ éléments/ml. provenant d'un seul animal.

TAMPONS				
	VERONAL 0,1 M		GLYCINE 0,1 M	
Concentration en Zn	P libéré par 1×10^6 leucocytes	pH	P libéré par 1×10^6 leucocytes	pH
0	35,00	9,45	33,00	9,50
5×10^{-4} M	9,60	9,45	40,00	9,50
5×10^{-3} M	1,00	9,30	38,00	9,40

TABLEAU N° 30

Tampon : 1) Véronal sodique 0,1 M à pH 9,4

2) Glycine 0,1 M + NaOH N à pH 9,4

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Zn introduit sous forme d'acétate à doses variables

Leucocytes : $9,5 \times 10^6$ éléments/ml. provenant de 3 cobayes normaux.

Concentration en Zn	Tampon véronal	pH obtenus	Tampon glycine	pH obtenus
	P libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes		P libéré (en μg) par 1×10^6 leucocytes	
0	34,00	9,30	33,00	9,30
4×10^{-3} M	2,00	9,30	37,00	9,25
4×10^{-2} M	0,50	9,30	30,00	9,25
4×10^{-1} M	0	9,25	21,00	9,20

Conclusions : Dans nos conditions opératoires, le zinc a un pouvoir inhibiteur important, sauf en présence de glycine. En effet, lorsque les dosages sont faits en présence du tampon glycine, une activation apparaît tant qu'une certaine concentration en zinc n'est pas atteinte. On peut émettre l'hypothèse suivante : en se combinant, zinc et glycine neutralisent leurs pouvoirs inhibiteurs, permettant aux effecteurs naturels existant dans les cellules de jouer leur rôle.

d) Effet de l'acide borique sur la PME alcaline

L'étude des résultats rapportés dans le tableau n° 5 (page 39) montre l'action inhibitrice de l'acide borique sur la PME alcaline.

e) Effet du Magnésium, du Zinc et de l'acide borique, sur la PME acide

Une seule série d'essais a été réalisée ici. Le tableau n° 30 bis réunit les résultats de ces expériences.

TABLEAU N° 30 bis

Tampons : 1) Acide acétique-acétate de Na 0,1 M à pH 4,7
 2) Glycine 0,1 M à pH 4,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : 1) Mg introduit sous forme de chlorure $2,5 \times 10^{-3}$ M
 2) Zn " " " d'acétate 5×10^{-4} M
 3) BO_3H " " " de borate de Na 3×10^{-3} M

Leucocytes : $10,5 \times 10^6$ éléments/ml.

Tampon	Effecteur	Essais n° 1	Essais n° 2	Moyenne	pH
		P minéral libéré par 1×10^6	(en μg) leucocytes		
Acétique	0	14,00	14,50	14,25	4,60
"	Cl_2Mg	14,00	14,50	14,25	4,65
"	$(\text{CH}_3\text{COO})^2\text{Zn}$	14,00	14,00	14,00	4,60
"	BO_3Na	14,00	14,00	14,00	4,65
Glycine	0	14,00	15,00	14,50	4,70
"	Cl_2Mg	14,00	14,00	14,00	4,70
"	$(\text{CH}_3\text{COO})^2\text{Zn}$	14,50	14,00	14,25	4,70
"	BO_3Na	14,00	14,00	14,00	4,70

Conclusions : A l'opposé de la PME alcaline, la PME acide des polynucléaires inflammatoires paraît insensible à l'action du Magnésium, du Zinc et de l'acide borique. !

2 - ETUDE DE L'ACTION D'UN EFFECTEUR PHYSIQUE : LE FROID

Dans le cadre d'une série d'essais concernant l'influence de la congélation sur la conservation des polynucléaires, nous avons voulu mesurer l'influence du froid sur la richesse en PME des polynucléaires inflammatoires. !

Une suspension de ces cellules dans l'eau physiologique était maintenue pendant 30 minutes à -80°C . En même temps, un échantillon identique était maintenu à 18° . Après décongélation lente du premier tube, les activités PME acide et alcaline étaient mesurées dans les deux échantillons. Les résultats en sont rapportés dans le tableau n° 31.

TABEAU N° 31

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH N, ajusté à pH 9,7

Tampon acide : Glycine 0,1 M, ajusté à pH 4,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

	P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes	
	En milieu alcalin	En milieu acide
Leucocytes maintenus à + 18°	75,00	15,90
Leucocytes maintenus à - 80°	80,00	14,80

Conclusions : La richesse des polynucléaires inflammatoires en PME acide et alcaline ne paraît pas modifiée considérablement lorsque l'on soumet des cellules à l'action momentanée d'une température de - 80°.

E . CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS BIOLOGIQUES

La série d'expériences, qui va être maintenant rapportée, est née de l'observation de divers phénomènes biologiques intéressant les polynucléaires inflammatoires.

Nous avons vu, dans la partie historique de ce travail, que les histochimistes constatent, en bordure d'une plaie ou d'une collection purulente, l'existence de polynucléaires à forte richesse en PME alcaline. Par ailleurs, on sait que les polynucléaires réunis dans une collection purulente subissent une dégénérescence qui se termine par une fonte lytique. Les phagocytoses, enfin, sont, on le sait, très actives au sein de ces collections. Nous nous sommes donc demandé si les cellules lysées ne contenaient pas de métabolites exaltant les activités PME des cellules inflammatoires non lysées. En somme, nous avons cherché à révéler une auto-exaltation possible de ces polynucléaires inflammatoires. Ce sera le but des recherches rapportées sous le premier paragraphe.

Dans le même ordre d'idée, évoquant les hypothèses de VERNE (122) rapportées page 19, nous avons cherché à mettre en évidence une action possible d'organes hématopoïétiques sous forme de broyats, avec l'espoir d'y révéler la présence d'un facteur exaltant les PME leucocytaires.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressé à une action possible de l'avitaminose C sur la richesse en PME des polynucléaires inflammatoires. (Des travaux de J.F. (DANIELLI et coll. (28) ont montré une diminution de la richesse en PME alcaline au sein des granulomes inflammatoires provoqués chez des animaux souffrant de l'avitaminose en question. Y a-t-il une relation entre cette avitaminose C et la richesse, en PME, des cellules inflammatoires ?

1 - INFLUENCE D'EXTRAITS LEUCOCYTAIRES OU D'EXTRAITS DE RATE

Les essais, ci-dessous rapportés, comportaient deux temps. D'une part, la mise en contact des polynucléaires inflammatoires avec les extraits en question, d'autre part, le dosage des PME. (

Pour le premier temps, les leucocytes lavés étaient mis en suspension dans l'un des quatre liquides suivants : (

- Eau physiologique. (
- Sérum de cobaye dilué à parties égales dans de l'eau physiologique.
- Sérum de cobaye dilué à parties égales avec un extrait de leucocytes inflammatoires. (
- Sérum de cobaye dilué à parties égales avec un extrait de rate.

L'extrait leucocytaire était préparé de la façon suivante :

10 ml. d'exsudat péritonéal (représentant 200 à 250 millions de polynucléaires inflammatoires) sont centrifugés; le culot est lavé deux fois à l'eau physiologique. On écrase, avec soin, en se servant de sable de Fontainebleau, les leucocytes ainsi isolés, puis, on reprend le tout par 1 ml., puis 9 ml., d'eau physiologique. Le tout est mis à centrifuger pendant 20 minutes à vive allure. Le liquide surnageant est dilué à parties égales avec du sérum de cobaye. (

L'extrait de rate était préparé par une méthode identique.

Pour chaque réactif choisi, deux tubes étaient préparés.

Dans chaque tube, le culot de 5 ml. d'exsudat péritonéal (contenant donc 100 à 125 millions de cellules) était repris par 5 ml. de réactif.

L'un des tubes était alors maintenu à 37° pendant 30 minutes, l'autre à 18° pendant 30 minutes également. (Les suspensions étaient centrifugées 2 minutes à 10.000 tours/min. (Les culots leucocytaires étaient alors lavés deux fois à l'eau physiologique (la deuxième suspension de lavage était passée à travers une gaze pour éliminer les agglomérats de leucocytes. (

La teneur en cellules de cette suspension était alors déterminée; puis, après centrifugation de cette suspension, le culot était repris par une quantité d'eau physiologique saponinée telle que 1 ml. corresponde à 10×10^6 leucocytes. (Ce dernier liquide servait au dosage de l'activité PME. (

Parallèlement étaient effectués des dosages de PME acide et alcaline avec les divers liquides biologiques qui avaient été au contact des cellules dans le premier temps de ces essais. Les résultats de deux expériences, réalisées comme nous venons de le dire, sont rapportés dans les deux tableaux n° 32 et 33.

TABLEAU N° 32

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH N ajusté à pH 9,7

Tampon acide : Glycine 0,1 M, ajusté à pH 4,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

Nature du liquide de suspension et température d'expérience	P min. (en μg) libéré par 1×10^6 leucocytes		P min. (en μg) libéré par 1 ml. de liquide de suspension correspondant au milieu	
	pH 9,7	pH 4,7	pH 9,7	pH 4,7
Eau 15° physiologique 37°	59,00	13,50	44,00	12,00
	63,00	15,00	39,00	15,00
Sérum 15° au 1/2 37°	61,00	14,50	115,00	27,00
	65,00	15,00	120,00	27,00
Extrait leucocy- 15° taire + sérum 37°	74,00	16,70	215,00	58,50
	67,50	16,50	205,00	58,50
Extrait de rate 15° + sérum 37°	86,00	17,40	235,00	200,00
	74,00	17,20	250,00	190,00
Sérum de cobayes au $\frac{1}{2}$	-	-	92,00	18,50

TABLEAU N° 33

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH N ajusté à pH 9,7

Tampon acide : Glycine 0,1 M ajusté à pH 4,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

Nature du liquide de suspension et température d'expérience	P min. (en μ g) libéré par 1×10^6 leucocytes		P min. (en μ g) libéré par 1 ml. de liquide de suspension correspondant au milieu	
	pH 9,7	pH 4,7	pH 9,7	pH 4,7
Eau 15°	69,00	12,60	42,00	10,00
physiologique 37°	70,00	12,00	36,00	8,00
Sérum 15°	72,00	13,50	110,00	30,00
au 1/2 37°	74,00	13,80	120,00	26,00
Extrait leucocy- 15°	94,00	16,90	210,00	44,00
taire + sérum 37°	90,00	16,00	200,00	40,00
Extrait de rate 15°	115,00	16,50	230,00	198,00
+ sérum 37°	95,00	16,00	250,00	188,00
Sérum de cobayes au $\frac{1}{2}$	-	-	90,00	18,00

Conclusions : L'extrait leucocytaire, et surtout l'extrait de rate, semblent avoir un pouvoir activateur certain sur la PME alcaline des polynucléaires inflammatoires. La même action est moindre pour la PME acide. Mais, pour reconnaître une quelconque valeur à ces résultats, il est nécessaire de discuter et justifier le mode opératoire.

La lecture des résultats, concernant l'eau physiologique, montre qu'il y a passage de PME dans ce liquide au cours des manipulations.

Il s'agit probablement d'altération mécanique des leucocytes, lors de la remise en suspension des culots, qui, rappelons-le, se fait à l'aide d'un agitateur.

Nous avons déjà vu dans le chapitre consacré à la mise au point de la technique, que cette perte est sensiblement constante d'une opération à l'autre. Nous pouvons ici la chiffrer.

Prenons le cas de l'expérience du tableau n° 32. L'exsudat péritonéal utilisé contenait environ 20×10^6 cellules/ml. Donc, dans 5 ml., 100×10^6 cellules avaient une activité PME alcaline évaluable à $5.900 \mu\text{g}$ de P dans les conditions opératoires. Ces cellules étaient reprises par 5 ml. d'eau physiologique, qui contenaient, après séparation, une PME alcaline évaluée à $44 \mu\text{g}$ de P par ml., soit $220 \mu\text{g}$ pour les 5 ml. La perte est donc chiffrable à environ 4 %. Si l'on compare les résultats fournis par les expériences utilisant le sérum au 1/2, on constate que, là où le sérum a été en contact avec les cellules, ce sérum s'est enrichi aussi en PME acide et alcaline. Donc les manipulations peuvent amener une perte d'enzyme de 4 à 5 %, mais les variations observées par ailleurs ne peuvent être imputables à ce fait puisque la perte dont nous parlons ici est sensiblement constante. On peut se demander si l'augmentation est due à l'adsorption des liquides biologiques à la surface des cellules. Voici nos réponses :

1) Quand on met un culot de leucocytes traité comme ci-dessus en présence d'eau physiologique et qu'on agite le tout *sans utiliser d'agitateur*, le liquide séparé ne contient pas de PME acide et alcaline. Il faut une action mécanique (qui lèse les cellules) pour voir apparaître les PME dans le liquide de suspension.

2) Quand on compare les valeurs des PME pour les essais avec l'eau physiologique et le sérum, on voit que ces valeurs sont sensiblement les mêmes; donc, le sérum n'a pas été adsorbé à la surface des cellules. (voir confirmation de ce fait page 76).

Une autre objection pourrait être faite : celle-ci concernant la possibilité du passage des PME sériques ou tissulaires au travers des parois leucocytaires, donc, la possibilité d'un apport centripète. Mais là encore les résultats fournis, par les expériences utilisant le sérum, répondent par la négative. D'ailleurs, si les échanges intéressant les PME se produisaient au travers des parois, on devrait tendre vers un équilibre : or, ce n'est pas le cas. La PME acide des leucocytes mise en présence de l'extrait de rate (qui a une forte activité PME acide) reste très faible. Remarquons enfin que, bien que les extraits de leucocytes et de rate aient sensiblement les mêmes activités PME alcaline par ml., les valeurs PME des leucocytes traités sont plus élevées dans le cas de l'extrait de rate.

On est donc conduit à envisager le passage, au travers des parois, de métabolites ayant le pouvoir d'exalter les activités PME alcaline et, à un moindre degré, les activités PME acide des polynucléaires inflammatoires. (

2. INFLUENCE DE L'AVITAMINOSE C

Cette expérience a été réalisée en deux temps.

Dans le premier temps, parallèlement à une série de dosages effectués sur les animaux normaux qui recevaient une nourriture hivernale (voir ci-dessus page 59), des mesures ont été faites avec des leucocytes provenant d'animaux soumis, pendant la même période, à un régime scorbutigène. (

Six cobayes avaient été mis en expérience. Les résultats les concernant sont réunis dans le tableau n° 34. (

TABLEAU N° 34

Tampon alcalin : Véronal 0,1 M ajusté à pH 9,8

Tampon acide : Acide acétique-acétate de Na M à pH 4,8

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}\text{M}$

Leucocytes : Nombre variable selon l'exsudat examiné, mais suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

N° des cobayes	Nb. de leucocytes ($\times 10^6$) par ml. d'exsudat péritonéal	P min. (en μg) libéré par 1×10^6 leucocytes	
		PME alcaline	PME acide
1	3,5	79,00	27,00
2	8,3	50,00	14,00
3	12,9	47,00	17,40
4	7,25	57,00	20,50
5	12,27	41,50	10,40
6	7,0	48,50	12,00
		Moyenne : 53,8 Sigma : $\pm 12,25$	Moyenne : 16,85 Sigma : $\pm 6,1$

Si l'on compare les tableaux n° 25 et n° 34, on constate que les résultats sont très proches pour la PME acide, mais que la PME alcaline semble en moyenne plus faible chez les cobayes scorbutiques. Cependant, là encore, la détermination des rapports critiques montre que les différences ne sont pas statistiquement significatives (pour la PME alcaline $t = 1,94$ et pour la PME acide, $t = 0,3$). Il faut toutefois noter que les taux de PME sont très différents d'un animal à l'autre. Aussi, avons nous voulu recommencer l'expérience de la façon suivante : Chaque lot de cobaye était divisé en deux groupes égaux. L'un d'eux recevait une nourriture de printemps normale (voir tableau n° 26), l'autre une ration scorbutigène. Les dosages étaient effectués le même jour pour les cellules venant d'animaux normaux ou scorbutiques. L'ensemble des résultats concernant les animaux scorbutiques est consigné dans le tableau n° 35. Ils sont à comparer à ceux du tableau n° 26 consacré aux cobayes normaux.

TABLEAU N° 35

Tampon alcalin : Véronal 0,1 M ajusté à pH 9,8

Tampon acide : Acide acétique-acétate de Na M à pH 4,8

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : $\text{Cl}_2\text{Mg } 2,5 \times 10^{-3} \text{ M}$

Leucocytes : Nombre variable selon l'exsudat examiné, mais suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

N° des cobayes	Nb. de leucocytes ($\times 10^6$) par ml. d'exsudat péritonéal	P min. (en μg) libéré par 1×10^6 leucocytes	
		PME alcaline	PME acide
1	19,5	76,00	17,50
2	19,4	82,00	22,00
3	22,4	56,00	11,80
4	28,4	40,00	12,70
5	20,8	46,00	13,90
6	22,5	45,00	22,20
7	26,7	55,00	12,70
8	23,9	56,00	12,20
9	12,6	36,00	13,80
10	17,4	68,50	14,50
11	24,9	67,00	12,80
12	9,7	62,00	15,50
13	4,0	68,50	15,50
14	8,0	72,50	26,00
		Moyenne : 59,3 Sigma : $\pm 11,85$	Moyenne : 15,9 Sigma : $\pm 4,4$

Là encore, le rapport critique est égal à 0,159 pour la PME alcaline et 0,31 pour la PME acide ; les différences sont sans signification statistique.

F - CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA PHAGOCYTOSE

Dans le laboratoire du Docteur DELAUNAY, S. BAZIN et C. AVICE avaient démontré que l'acte phagocytaire entraîne une diminution de la richesse des leucocytes inflammatoires en glycogène (3). (Y a-t-il, à ce moment, modification de l'activité phosphatasique ? Plusieurs auteurs se sont penchés sur ce problème.)

Ainsi, K. ZARZEWSKI et coll. ont montré que la phagocytose ne modifie pas le turnover des esters phosphoriques au niveau des leucocytes (131). H.J. BECKER et coll. considèrent, eux, que la phagocytose entraîne, pour les polynucléaires circulants, une augmentation de la richesse en PME alcaline (5). (Par contre, nombreux sont les auteurs qui estiment que les polynucléaires inflammatoires sont plus riches en PME alcaline que les polynucléaires circulants, qu'il y ait ou non phagocytose à leur niveau (38, 119, 117, 118, 83). Nos expériences se sont efforcées de clarifier le problème.)

1 - ESSAIS PRELIMINAIRES

Le processus opératoire était le suivant :

10 ml. de suspension homogène de polynucléaires inflammatoires contenant 10×10^6 éléments/ml. sont centrifugés à faible vitesse (2 minutes à 1.800 tours/minute). Le culot est repris par 10 ml. de sérum frais de cobaye, dilué au 1/2 dans de l'eau physiologique. On ajoute alors 10 gouttes d'une suspension concentrée de germes microbiens (2 milliards de germes par ml.). Les tubes à centrifuger, fermés par un bouchon à vis, qui sont utilisés pour cette expérience, sont alors portés dans une étuve à 37° C pendant 30 minutes.)

Au bout de ce temps : centrifugation de 2 minutes à 1.800 t/min.

Les leucocytes forment un culot, tandis que les microbes, non phagocytés, restent en suspension dans le liquide surnageant. Ce liquide est rejeté.)

Le culot est ensuite lavé deux fois dans de l'eau physiologique, puis repris, à l'aide d'un agitateur, par 10 ml. d'eau physiologique saponifiée.

Pratiquement, la phagocytose était mise en route dans trois tubes différents avec des cellules de même origine. Deux tubes servaient au dosage qui était effectué en double depuis le début des opérations (colonnes verticales «a» et «b», pour chaque tampon, dans le tableau ci-dessous). Le contenu du troisième tube était utilisé pour un contrôle de la phagocytose ; après la dernière centrifugation, des prélèvements étaient faits sur le culot pour vérifier l'existence ou l'absence de phagocytose, par étalement sur lame et coloration au bleu de méthylène. (La phagocytose concernait deux types de germes :

- 1) Des staphylocoques dorés (pour lesquels la phagocytose est toujours intense),
- 2) Des bacilles d'Eberth smooth (qui sont normalement de phagocytose difficile).)

A côté de ces six tubes (3 pour le staphylocoque et 3 pour le bacille d'Eberth), deux témoins étaient préparés, en double pour chacun d'eux.

Le premier témoin était représenté par 10 ml. de suspension leucocytaire traités suivant le processus habituel, mais qui ne recevaient aucun germe. Le deuxième était identique en sa réalisation, cependant il était privé, lui, à la fois de germes et de sérum.

Le premier de ces témoins permettait une étude comparative avec ce qui se passe là où il y avait eu phagocytose.

La comparaison des deux témoins devait permettre de révéler une absorption possible des PME sériques par les cellules en expérience ou une adsorption possible à leur surface.

Les résultats de cette expérience sont rapportés dans le tableau n° 36, les valeurs indiquées étant, comme d'habitude, la moyenne arithmétique de deux déterminations.

TABLEAU N° 36

Tampons alcalins : 1) glycine 0,1 M + NaOH N ajusté à pH 0,7
2) véronal 0,1 M ajusté à pH 9,75

Tampons acides : 1) acide acétique-acétate de Na M à pH 4,75
2) glycine 0,1 M ajusté à pH 4,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension ajustée à 10×10^6 éléments/ml, provenant de 5 cobayes normaux.

		P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes							
		Tampon glycine alcalin		Tampon véronal alcalin		Tampon glycine acide		Tampon acétique acide	
		(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
A	Leucocytes repris par eau sans microbes	58,00	58,00	59,50	62,50	17,00	15,50	14,75	15,25
B	Leucocytes repris par sérum de cobayes au 1/2 sans microbes	58,00	-	59,50	59,50	15,70	14,70	14,60	14,40
C	Leucocytes + staphylocoques. Avec phagocytose :	56,00 +++	57,00 +++	57,50 +++	55,50 +++	14,40 +++	15,50 +++	14,40 +++	15,00 +++
D	Leucocytes + bacilles typhiques Avec phagocytose :	56,50 0	56,50 0	56,50 0	56,50 0	15,60 0	14,60 0	14,30 0	14,30 0

Nota : Les signes indiquent l'importance de la phagocytose

Conclusions : Elles sont fort nettes : la richesse en PME alcaline et acide des polynucléaires inflammatoires n'est pas influencée par la phagocytose des staphylocoques dorés ou la présence, sans phagocytose, de bacilles d'Eberth smooth (comparaison entre les bandes horizontales B, C et D).

D'autre part, le contact avec du sérum de cobaye ne modifie pas le taux des deux PME leucocytaires (comparaison entre les bandes horizontales A et B). Il n'y a donc pas d'absorption ou d'adsorption de ces enzymes au niveau des parois cellulaires. Cette conclusion renforce celle du paragraphe précédent consacré à l'action d'extrait de leucocytes ou d'organes (voir ci-dessus page 71).

L'expérience précédente a été renouvelée trois fois avec un mode opératoire quelque peu modifié ; seul, le staphylocoque doré était employé et la phagocytose se déroulait tantôt à la température ordinaire, tantôt à 37°.

Le protocole opératoire était donc le suivant :

L'exsudat péritonéal, filtré sur gaze en quatre épaisseurs, pour éliminer les agglomérats de leucocytes, était centrifugé.

Le culot, lavé deux fois, était remis en suspension dans l'eau physiologique. Après filtration sur gaze, était faite une numération des cellules de la suspension. Par dilution convenable de celle-ci, le nombre d'éléments était finalement ramené à 10×10^6 par ml.

La suspension était alors divisée en deux fractions de volume connu. Ces deux fractions étaient centrifugées et les deux culots lavés, remis en suspension, l'un dans l'eau physiologique, l'autre dans du sérum de cobaye.

Chacune de ces suspensions était à nouveau divisée en deux fractions. L'une recevait 5 gouttes d'eau physiologique, l'autre 5 gouttes de suspension aqueuse de staphylocoques dorés.

Le contenu des quatre tubes, ainsi préparés, était finalement divisé en deux parties. L'une était centrifugée immédiatement avant la phagocytose (témoin) ; l'autre était maintenue à 37° pendant 30 minutes (pour permettre la phagocytose).

Trois essais ont été faits selon cette technique. Les résultats en sont rapportés dans le tableau n° 37.

TABLEAU N° 37

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH ajusté à pH 9,7

Tampon acide : Glycine 0,1 M ajusté à pH 4,75

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension ajustée à 1×10^6 éléments/ml., provenant pour chaque série d'essais, d'un lot de 5 à 6 cobayes normaux.

N° des essais	P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes					
	En milieu alcalin			En milieu acide		
	1	2	3	4	5	6
Eau physiologique (centrifugation immédiate)	54,00	71,00	55,00	12,00	12,50	15,00
Eau physiologique (30' à 37°)	55,00	76,00	53,00	12,50	12,50	15,00
Eau physiol. + staphylocoques (centrifugation immédiate)	53,00 ±	73,00 ±	57,00 ±	11,00 ±	12,00 ±	16,00 ±
Eau physiol. + staphylocoques (30' à 37°)	53,00 ±	71,00 ±	53,00 ±	12,00 ±	11,00 ±	15,50 ±
Sérum (centrifug. immédiate)	55,00	72,00	58,00	12,50	12,00	16,00
Sérum (30' à 37°)	55,00	73,00	53,00	-	12,00	15,50
Sérum + staphylocoques (centrifugation immédiate)	53,00 +	70,00 ++	57,00 +	11,00 ++	11,00 ++	15,00 +
Sérum + staphylocoques (30' à 37°)	54,00 ++++	69,00 ++++	54,00 ++++	11,00 ++++	11,00 ++++	15,50 ++++

NOTA : Les signes + et ± indiquent l'importance de la phagocytose.

Conclusions : L'étude de ce tableau montre que la phagocytose n'est importante qu'en présence de sérum sanguin, et, que là où elle a lieu, elle n'influe pas sur la richesse des polynucléaires inflammatoires en PME acide ou alcaline.

2 - ETUDE STATISTIQUE

Nous avons voulu dans un troisième temps faire une étude statistique du phénomène, chacun des essais étant réalisé avec les leucocytes provenant d'un seul animal.

Le protocole opératoire était alors simplifié. Trois tubes étaient préparés :

- 1) Tube témoin sans germes ;
- 2) Tube avec des staphylocoques dorés ;
- 3) Tube avec des bacilles d'Eberth.

Dans chaque cas, la réaction avait lieu en présence de sérum de cobaye. Les résultats sont résumés dans les tableaux n° 38 pour la PME alcaline et n° 39 pour la PME acide.

TABLEAU N° 38

Tampon : Glycine 0,1 M + NaOH N ajusté à pH 9,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension de leucocytes ajustée à 10×10^6 éléments/ml., provenant d'une série de cobayes sains.

N° des essais	P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes		
	Absence de germes	Présence de E-Typhosa (smooth)	Présence de Staphylocoques
1	58,00	58,50	56,00
2	57,00	56,50	57,00
3	58,00	59,50	56,60
4	59,50	57,50	57,50
5	62,50	56,50	55,50
6	61,00	56,50	56,50
7	54,00	-	53,00
8	71,00	-	70,00
9	55,00	-	57,00
10	76,00	-	69,00
11	55,00	-	54,00
12	53,00	-	54,00
	Moyenne : 58,0 Sigma : $\pm 5,55$		Moyenne : 59,1 Sigma : $\pm 5,15$

TABLEAU N° 39

Tampon : Glycine 0,1 M + NaOH N ajusté à pH 4,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Leucocytes : Suspension de leucocytes provenant de cobayes sains, ajustée à 10×10^6 éléments/ml.

N° des essais	P min. libéré (en μ g) par 1×10^6 leucocytes		
	Absence de germes	Présence de E-Typhosa (smooth)	Présence de Staphylocoques
1	17,00	15,50	14,50
2	15,50	14,50	15,50
3	16,00	15,00	15,00
4	15,00	14,50	14,50
5	15,50	14,50	15,00
6	15,00	15,00	15,00
7	12,00	-	11,00
8	12,50	-	12,00
9	15,00	-	15,00
10	12,50	-	12,00
11	12,50	-	11,00
12	15,00	-	15,50
	Moyenne : 14,45 Sigma : $\pm 1,65$		Moyenne : 13,80 Sigma : ± 2

Conclusions : Ces essais confirment les précédents. ¹

Les rapports critiques sont, pour un degré de liberté de 22 : de 0,69 pour la PME alcaline et de 1,2 pour la PME acide.

Donc, différences sans signification statistique.

3 - ADDENDUM

Les recherches sur la phagocytose, que nous venons d'exposer, étaient déjà faites lorsque fut publié un important travail de H.J. BECKER, G. MUNDER et H. FISCHER (5), qui indiquait que la phagocytose de germes microbiens, par des polynucléaires isolés du sang circulant entraîne une élévation de l'activité de la PME alcaline au sein de ces cellules. (Ces résultats, on le voit, se trouvaient tout à fait à l'opposé des nôtres.)

Intrigués, comme on l'imagine, nous avons jugé bon de reprendre le problème.

La différence majeure, entre les essais effectués à l'étranger et les nôtres, résidait dans la nature des cellules utilisées. H.J. BECKER et coll. se servaient de leucocytes provenant du sang circulant de cobaye : de notre côté, nous mettions en jeu des polynucléaires inflammatoires, isolés d'exsudats péritonéaux aseptiques, provoqués chez le cobaye adulte.

Nous avons donc voulu recommencer nos expériences avec des leucocytes du sang circulant. (Il ne nous a pas été possible d'utiliser des leucocytes de cobaye. Notre mode opératoire nécessitant de grosses quantités de cellules, il était nécessaire de sacrifier un trop grand nombre d'animaux.)

Nous nous sommes donc adressés au sang de cheval.

La préparation des leucocytes se faisait selon le processus suivant :

Un litre de sang était prélevé, par ponction de la jugulaire, et réparti dans deux éprouvettes de 1 litre contenant une faible quantité de solution d'héparine. (Les éprouvettes étaient placées à 45° par rapport à l'horizontale dans une étuve à 37° pendant 30 minutes. (Ce temps écoulé, les hématies sont spontanément sédimentées ; le plasma sur-nageant est séparé avec précautions à l'aide de pipettes à boules ; il contient en suspension : des leucocytes, des plaquettes et des hé-maties en petit nombre. (Par centrifugation du plasma à petite vitesse (2.000 tours/minute) pendant 2 minutes, on sépare les leucocytes (et quelques hématies) des plaquettes. (Après lavage à l'eau physiologique, répété deux fois, on prépare, à partir du culot, une suspension de leucocytes qu'on filtre sur quatre couches de gaze hydrophile.)

Après numération et établissement de la formule leucocytaire, on prépare par dilution appropriée du milieu, une suspension contenant 10×10^6 polynucléaires par ml. Avec cette suspension, étaient effectuées des réactions phagocytaires suivant la technique décrite ci-dessus.

Des dosages de PME acide et alcaline avaient lieu ultérieurement. Pour chaque essai, deux tubes étaient préparés, l'un, où se déroulait la phagocytose, l'autre, sans microbes, servant de témoin. Les résultats de nos dosages ont été réunis dans le tableau n° 40.

TABLEAU N° 40

Tampon alcalin : Glycine 0,1 M + NaOH N ajusté à pH 9,7
 Tampon acide : Glycine 0,1 M + NaOH N ajusté à pH 4,7
 Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M
 Effecteur : Néant
 Leucocytes : Polynucléaires isolés du sang circulant de cheval et ajusté à 10×10⁶ éléments/ml.

N° des essais	P min. (en µg) libéré pour 1 × 10 ⁶ leucocytes			
	PME alcaline phagocytose		PME acide phagocytose	
	avec	sans	avec	sans
1	30,00	19,00	22,00	8,00
2	31,00	24,00	24,00	4,00
3	33,00	27,00	27,00	8,00
4	35,00	31,00	26,00	9,00
5	30,00	24,00	16,00	10,00
6	36,00	26,00	20,00	9,00
7	-	26,00	21,00	8,00
8	29,00	28,00	21,00	9,00
9	33,00	20,00	24,00	-
10	33,00	20,00	-	-
11	26,00	15,00	15,00	10,00
12	27,00	16,00	17,00	9,50
13	27,00	17,00	17,00	9,00
14	29,00	15,00	19,00	8,00
15	31,00	17,00	20,00	9,00
16	32,00	17,00	20,00	9,00
	Moy. t 30,4 Sig. t ± 2,89	Moy. t 22 Sig. t ± 5,46	Moy. t 20,6 Sig. t ± 3,56	Moy. t 8,55 Sig. t ± 1,47

Conclusions : Pour la PME alcaline et la PME acide des nouvelles suspensions cellulaires étudiées, ont été observées des variations sensibles en fonction de la phagocytose. Dans les deux cas, le calcul des rapports critiques indique qu'il s'agit de différences statistiquement significatives : $t = 7,24$ pour la PME alcaline et $t = 16,5$ pour la PME acide.

Il est à noter que les suspensions contenaient, outre des polynucléaires, d'autres cellules, dont de grands mononucléaires, ainsi que 20 à 25 % d'hématies. Nous avons vérifié que les hématies ne possèdent pas de pouvoir PME notable *dans nos conditions expérimentales*. D'autre part, tous les auteurs s'accordent pour nier la présence de PME alcaline en quantité importante dans les cellules de la série lymphoïde (44, 124, 121, 122, 80).

On peut donc conclure, comme l'ont fait les auteurs allemands, à une modification de la richesse en PME alcaline et en PME acide dans les polynucléaires du sang circulant, au cours de la phagocytose, la PME acide étant, des deux, la plus modifiée.

Comment concilier ces résultats apparemment divergents ? Nous aborderons ce sujet dans nos conclusions finales.



CHAPITRE IV

LES MACROPHAGES

Les macrophages sont de grandes cellules que l'on rencontre en nombre important dans les réactions inflammatoires sub-aiguës ou chroniques. (Elles résultent, rappelons-le, de la métamorphose d'éléments divers : histiocytes, fibroblastes, monocytes, lymphocytes, etc..)

Après l'étude des PME des polynucléaires inflammatoires, témoins des réactions aiguës, il nous a paru intéressant d'examiner les mêmes enzymes dans cet autre grand groupe de cellules phagocytaires que constituent les macrophages, ces témoins des réactions sub-aiguës ou chroniques.

Jusqu'à présent, les PME macrophagiques n'ont inspiré qu'un nombre très restreint de travaux.

Notre technique opératoire, pour la mise en évidence de PME dans les macrophages était identique à celle décrite précédemment. En revanche, le mode de préparation de la suspension des macrophages était différent. Nous le décrirons dans le premier paragraphe de ce chapitre. Le second paragraphe sera consacré à la détermination des pH optimum d'action. Le résultat inattendu des mesures nous conduira à faire une longue étude pour discuter la validité des dosages effectués. Après cela, nous décrirons quelques expériences complémentaires consacrées à l'influence possible de quelques effecteurs des PME.

A - PREPARATION DES MACROPHAGES

Nous avons retiré les macrophages, nécessaires à nos essais, d'exsudats péritonéaux aseptiques. Ces exsudats avaient été provoqués chez le cobaye par injection, au sein de la séreuse, de 18 ml. d'huile de paraffine. Quatre jours après l'injection, les cobayes étaient sacrifiés, la cavité péritonéale et le contenu abdominal soigneusement lavés avec de l'eau physiologique. Ce liquide de lavage contenait en suspension, outre des gouttelettes d'huile de paraffine, des leucocytes et des macrophages. Les macrophages étaient, de loin, les cellules les plus nom-

breuses. Le pourcentage des polynucléaires rencontrés, quelque peu variable d'un cas à l'autre, reste, dans l'immense majorité des cas, inférieur à 5 %. Le liquide de lavage recueilli était aussitôt centrifugé à petite vitesse (1000 tours/minute) pendant 2 minutes. Le culot obtenu était remis en suspension dans l'eau physiologique. Cette opération, faite pour assurer un parfait lavage des éléments figurés, était renouvelée deux fois. Après la dernière centrifugation, les cellules étaient reprises par 10 ml. d'eau physiologique saponinée à 2 %. La numération des éléments était faite immédiatement après cette mise en suspension. L'opération est possible, les cellules restant, dans cette suspension, bien visibles pendant quelques minutes. Finalement, le liquide était traité, pour la détermination des activités PME, selon la technique classique rapportée dans le chapitre consacré à la mise au point de la méthode de dosage.

B - DETERMINATION DES pH OPTIMUM D'ACTION

1 - PREMIERS TRAVAUX

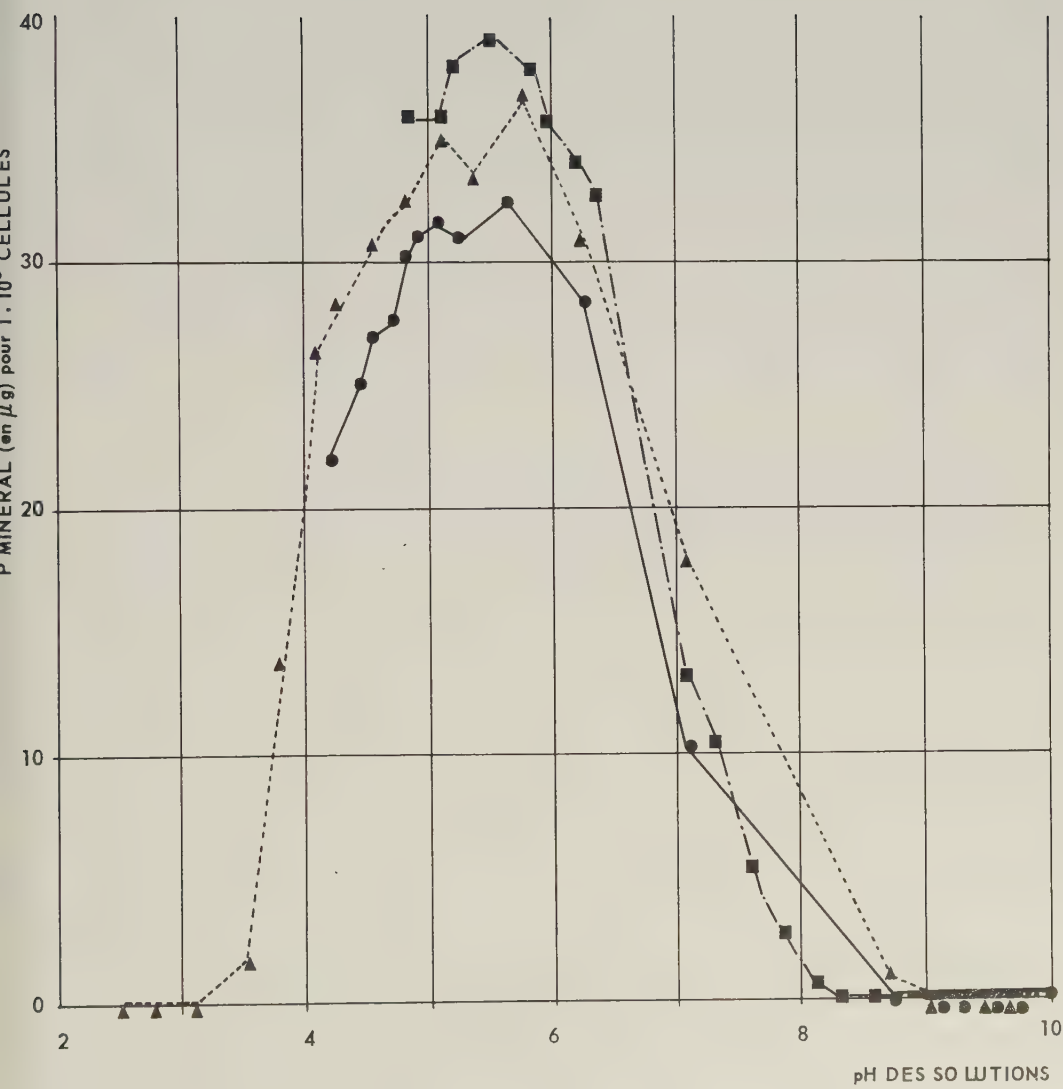
Dans une série d'expériences consacrées à six exsudats provenant de six cobayes différents, nous avons recherché une activité PME dans les zones de pH optimum que nous avions déterminées pour les polynucléaires (soit une zone voisine de pH 5 et une autre zone voisine de pH 9,7). Ces essais sont rapportés dans le tableau n° 41.

TABLEAU N° 41

Tampons : 4 tampons différents : A) Glycine 0,1 M à pH 4,9
 B) Acide acétique-acétate de Na 0,1 M pH 4,75
 C) Glycine 0,1 M à pH 9,7
 D) Véronal 0,1 M à pH 9,75
 Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M
 Effecteur : Néant
 Matériel enzymatique : Macrophages provenant de 6 exsudats péritonéaux pauvres en polynucléaires (- de 5 %)

N° des exsudats	Nb de macrophages ajoutés à chaque tube	Durée d'incubation en minutes	P min. libéré (en µg) par 1×10^6 macrophages avec les tampons suivants:			
			A	B	C	D
1	$2,8 \times 10^6$	60	19,80	20,20	0	0
2	5×10^6	60	19,80	20,25	0	0
3	$7,7 \times 10^6$	60	31,75	32,10	0	0
4	$4,3 \times 10^6$	120	39,75	45,50	traces	traces
5	$4,1 \times 10^6$	120	68,00	76,00	traces	traces
6	$6,3 \times 10^6$	120	36,00	38,00	traces	traces

FIGURE 12



On remarque immédiatement, à la lecture de ce tableau, qu'en milieu alcalin il n'y a pas de libération de phosphore minéral, si ce n'est en traces dûes à la présence, dans les exsudats, de polynucléaires en faible quantité. Intrigués par ce fait, nous avons voulu préciser les valeurs des activités PME à différents pH. Tel a été l'objet d'une nouvelle série d'essais. (

Trois essais au total méritent d'être signalés, certaines modalités opératoires et certains éléments restant identiques dans tous les cas, à savoir : durée d'incubation, substrat, effecteur, tampon. Les résultats sont résumés sur les figures n° 12. (

On voit que ces essais ne mettent pas en évidence de PME alcaline, cependant l'existence de deux pH optimum pour l'activité PME acide apparaît possible (pH 5,10 et 5,80). (

La PME alcaline a la réputation d'être très répandue dans le règne animal. On imagine donc notre surprise devant ces résultats.

Quelle explication convenait-il de leur donner ? Le processus opératoire était-il en cause ? Une justification expérimentale s'imposait. Tel fut le but de nouvelles expériences. (

2 - DISCUSSION

a - Influence de l'huile de paraffine.

Nous nous sommes d'abord demandés, si dans le cas présent, la PME alcaline n'avait pas été inhibée par l'huile de paraffine utilisée pour déclencher l'apparition des exsudats péritonéaux (effectivement, l'examen microscopique des macrophages, retirés de ces exsudats, montre, dans leur sein, de nombreuses gouttelettes d'huile). Pour élucider ce point, nous avons décidé d'étudier l'influence de l'huile de paraffine sur la PME alcaline des polynucléaires. (Ces derniers étaient obtenus par notre méthode habituelle. (

D'une part, nous avons ajouté, à 10 ml. d'une solution de polynucléaires en milieu physiologique, 11 ml. d'huile de paraffine, puis, nous avons agité ce mélange régulièrement toutes les 5 minutes. (Entre temps, le tube était maintenu au bain-marie à 37° C. (Au bout d'une heure, nous avons isolé et lavé les polynucléaires (un rapide examen au microscope permettait d'affirmer qu'ils n'avaient pas phagocyté d'huile) puis dosé, pour ces cellules, la PME alcaline par notre procédé habituel. (

D'autre part, nous avons fait certains dosages en présence d'huile de paraffine (cette dernière agissait donc, en ce cas, durant la période d'incubation). (Chaque fois un tube témoin était préparé : la suspension cellulaire y avait été remplacée par de l'eau physiologique saponifiée. (

TABLEAU N° 42

Tampon : 1 - Glycine 0,1 M à pH 9,7

2 - Véronal sodique 0,1 M à pH 9,75

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Huile de paraffine

Matériel enzymatique : Polynucléaires provenant d'un exsudat inflammatoire.

P min. libéré (en µg) par 1×10^6 polynucléaires traités au préalable par de l'huile de paraffine	Tampon Glycine	Tampon Véronal
	39,60	46,80
Témoins	39,50	46,50
P min. libéré (en µg) par 1×10^6 polynucléaires maintenus en présence d'huile de paraffine	Tampon Glycine	Tampon Véronal
	39,60	46,50
Témoins	39,60	46,60

Conclusions : L'huile de paraffine n'est pas capable d'inhiber l'activité de la PME alcaline des polynucléaires inflammatoires.

b - Recherche de la présence possible d'un inhibiteur naturel de la PME alcaline.

Nous nous sommes alors demandés si, dans les macrophages, n'existait pas un inhibiteur naturel vis à vis des PME alcalines rencontrées très généralement dans les cellules vivantes. Pour étudier ce nouvel aspect de la question, nous avons fait agir la PME alcaline provenant de polynucléaires en présence de macrophages.

En pratique, deux essais ont été réalisés selon le protocole suivant : Huit tubes contenant le substrat tamponné étaient répartis en quatre groupes de deux :

- Le premier groupe recevait par tube : 1 ml. de suspension de polynucléaires diluée au 1/2 dans de l'eau physiologique saponinée.
- Le second groupe recevait également par tube : 1 ml. d'une suspension de macrophages diluée au 1/2 par de l'eau physiologique saponinée.
- Le troisième groupe : 1 ml. d'un mélange fait à parties égales d'une suspension de polynucléaires et de macrophages utilisés ci-dessus.
- Le quatrième groupe : 1 ml. d'eau physiologique saponinée (témoin).

Premier essai : Tableau n° 43,

Deuxième essai : Tableau n° 44.

TABLEAU N° 43**Tampon :** Véronal 0,1 M à pH 9,65**Substrat :** Glycérophosphate de Na 0,025 M**Effecteur :** Néant**Matériel enzymatique :** Suspension contenant par ml. 12×10^6 polynucléaires et 4×10^6 macrophages.

Groupes de tubes	P min. libéré (en μ g) au cours de la réaction (moyenne de deux tubes)
1	329,00
2	0
3	327,00
4	0

TABLEAU N° 44**Tampon :** Véronal 0,1 M à pH 9,65**Substrat :** Glycérophosphate de Na 0,025 M**Effecteur :** Néant**Matériel enzymatique :** Suspension contenant par ml. $4,5 \times 10^6$ polynucléaires et 4×10^6 macrophages.

Groupes de tubes	Quantité de P min. (en μ g) libéré au cours de la réaction (moyenne de deux tubes)
1	98,50
2	0
3	99,50
4	0

Conclusions : La PME alcaline des polynucléaires n'est pas inhibée par des extraits de macrophages.

c - Recherche d'une PME alcaline de faible activité.

Sur les conseils de Monsieur le Professeur COURTOIS, nous avons alors tenté, pour les expériences dont il est ici question, de prolonger considérablement le temps d'incubation; celui-ci fut porté à 24 heures. Nous avons opéré à 3 pH différents, le premier nous mettant dans les limites d'activité de la PME acide des macrophages.

TABLEAU N° 45

Tampon : Véronal 0,1 M à pH 9,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : 1 - Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M
2 - Néant

Matériel enzymatique : Suspension provenant du mélange de 3 exsudats péritonéaux contenant par ml. 12×10^6 macrophages et $0,15 \times 10^6$ polynucléaires.

	pH	P min. libéré (en μg) pour 1 ml. de suspension cellulaire en 24 heures
Avec Cl_2Mg	8,40	37,00
	8,70	20,50
	9,50	26,50
Sans Cl_2Mg	8,10	95,50
	8,70	12,50
	9,50	16,00

La lecture de ce tableau montre qu'une faible activité phosphatase s'est manifestée en milieu alcalin. Mais n'oublions pas qu'ici notre préparation contenait une certaine quantité de polynucléaires. L'activité la plus forte se trouve au pH 8,4 et surtout 8,1, zone où les PME acides des macrophages et des polynucléaires d'une part, et la PME alcaline des polynucléaires d'autre part additionnent leurs activités.

Dans une nouvelle série d'essais, nous nous sommes servis d'une préparation plus riche en polynucléaires que les précédentes, à un pH voisin de 9,5, pour des durées d'incubation variables de 1 heure à 24 heures, cela afin de savoir si les activités PME alcalines trouvées ci-dessus étaient dues uniquement aux polynucléaires : en pratique,

nous avons eu recours à un exsudat péritonéal produit comme de coutume, c'est-à-dire par injection d'huile de paraffine, mais le prélèvement avait été fait au bout de trois jours seulement.

TABEAU N° 46

Tampon : Véronal 0,1 M à pH 9,7

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : 1 - Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M
2 - Néant

Matériel enzymatique : Préparation contenant par ml. 12×10^6 macrophages et $1,8 \times 10^6$ polynucléaires.

	Durée d'incubation à 37° en heures	P min. libéré (en μg) par 1 ml. de suspension cellulaire	Nombre de polynucléaires par ml. $\times 10^6$	P min. libéré (en μg) par 1×10^6 polynucléaires
Avec Cl_2Mg	1	78,00	1,8	43,30
	1,30	123,00	1,8	68,50
	2	161,00	1,8	89,50
	24	470,00	1,8	260,00
Sans Cl_2Mg	1	37,00	1,8	20,60
	1,30	62,00	1,8	34,50
	2	84,00	1,8	46,60
	24	432,00	1,8	240,00

A la lecture de ce tableau, on constate une certaine activité PME en milieu alcalin, toutefois, on a le droit d'admettre que seuls les polynucléaires en sont responsables, étant donné qu'on trouve des activités PME comparables à celles que donnent classiquement les polynucléaires.

Conclusions générales du paragraphe :

Elles pourraient être celles-ci : Dans les conditions expérimentales retenues par l'auteur, il a été impossible de mettre en évidence une PME active en milieu alcalin au sein des macrophages d'origine inflammatoire.

C - SUR QUELQUES CARACTERES DE LA PME ACIDE DES MACROPHAGES

1 - INFLUENCE DES PHOSPHATES

Le premier problème qui, évidemment, se posait ici, s'attachait à l'influence des phosphates libérés par la PME acide.

Nous avons employé le procédé classique comportant des dosages après des temps d'action croissants.

Première série de dosages :

Six mesures ont été effectuées (chaque dosage étant fait en double) avec une suspension d'un mélange de cellules provenant de six animaux différents. Les temps d'action choisis étaient de 15, 30, 45, 60 et 75 minutes.

Un groupe de tubes était aussi maintenu 18 heures et 30 minutes.

Les résultats sont rapportés dans le tableau n° 47.

TABLEAU N° 47

Tampon : Acide acétique-acétate de Na à pH 4,9

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : Néant

Matériel enzymatique : Suspension cellulaire contenant par ml. $7,6 \times 10^6$ macrophages.

Durée d'incubation en heures et minutes	P min. (en μ g) retrouvé dans l'essai	P min. (en μ g) libéré par 1×10^6 éléments	% de substrat hydrolysé
0.15	57,00	7,50	0,93
0.30	117,00	15,40	1,92
0,45	169,00	22,20	2,77
1,00	218,00	28,70	3,57
1.15	267,00	35,00	4,57
18.30	1.300,00	171,00	21,30

Pour les cinq premiers dosages, la quantité de P_2O_5 libéré a été sensiblement proportionnelle à la durée de l'incubation. Par contre, la quantité de substrat hydrolysé n'a pas dépassé 21 % pour une période de 18 heures 30 minutes.

Deuxième série de dosages :

Nous avons diminué la richesse en glycérophosphate du substrat, afin de déterminer le taux critique de glycérophosphate hydrolysé au-delà duquel apparaît une inhibition de la PME.

Les résultats sont résumés dans le tableau n° 48.

TABLEAU N° 48

Tampons : (a) Acide acétique-acétate de Na à pH 4,70
(b) Glycine à pH 4,70

Substrat : Glycérophosphate de Na $6,25 \times 10^{-3}$ M

Effecteur : Néant

Matériel enzymatique : Suspension cellulaire contenant par ml. $2,4 \times 10^6$ macrophages.

	Durée d'incubation en minutes	P min. (en μg) retrouvé dans la préparation		P min. (en μg) libéré par 1×10^6 cell.		% de substrat hydrolysé	
		(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
1	30	14,70	14,50	6,15	6,00	0,98	0,96
2	60	26,60	29,20	11,05	12,20	1,75	1,95
3	90	39,60	42,50	16,50	17,75	2,65	2,83
4	120	47,00	57,50	19,50	24,00	3,15	3,83
5	135	58,60	65,50	24,00	27,25	3,90	4,35
6	150	68,00	73,25	28,25	30,50	4,55	4,90
7	165	77,20	80,50	32,25	33,50	5,15	5,35

Tout d'ensemble est reporté sur la figure n° 13. On peut voir sur cette figure que jusqu'aux taux de 5,15 et 5,35 % de glycérophosphate hydrolysé, l'inhibition par le P minéral n'apparaît pas.

Troisième série d'essais :

Les conditions opératoires de la précédente expérience n'avaient pas permis d'atteindre le seuil d'inhibition. Cette série fut faite avec une suspension particulièrement riche en macrophages et provenant d'un groupe de huit cobayes. †

Les résultats sont résumés dans le tableau n° 49.

TABLEAU N° 49

Tampons : (a) Acide acétique-acétate de Na à pH 4,75
(b) Glycine à pH 4,70

Substrat : Glycérophosphate de Na $6,25 \times 10^{-3}M$

Effecteur : Néant

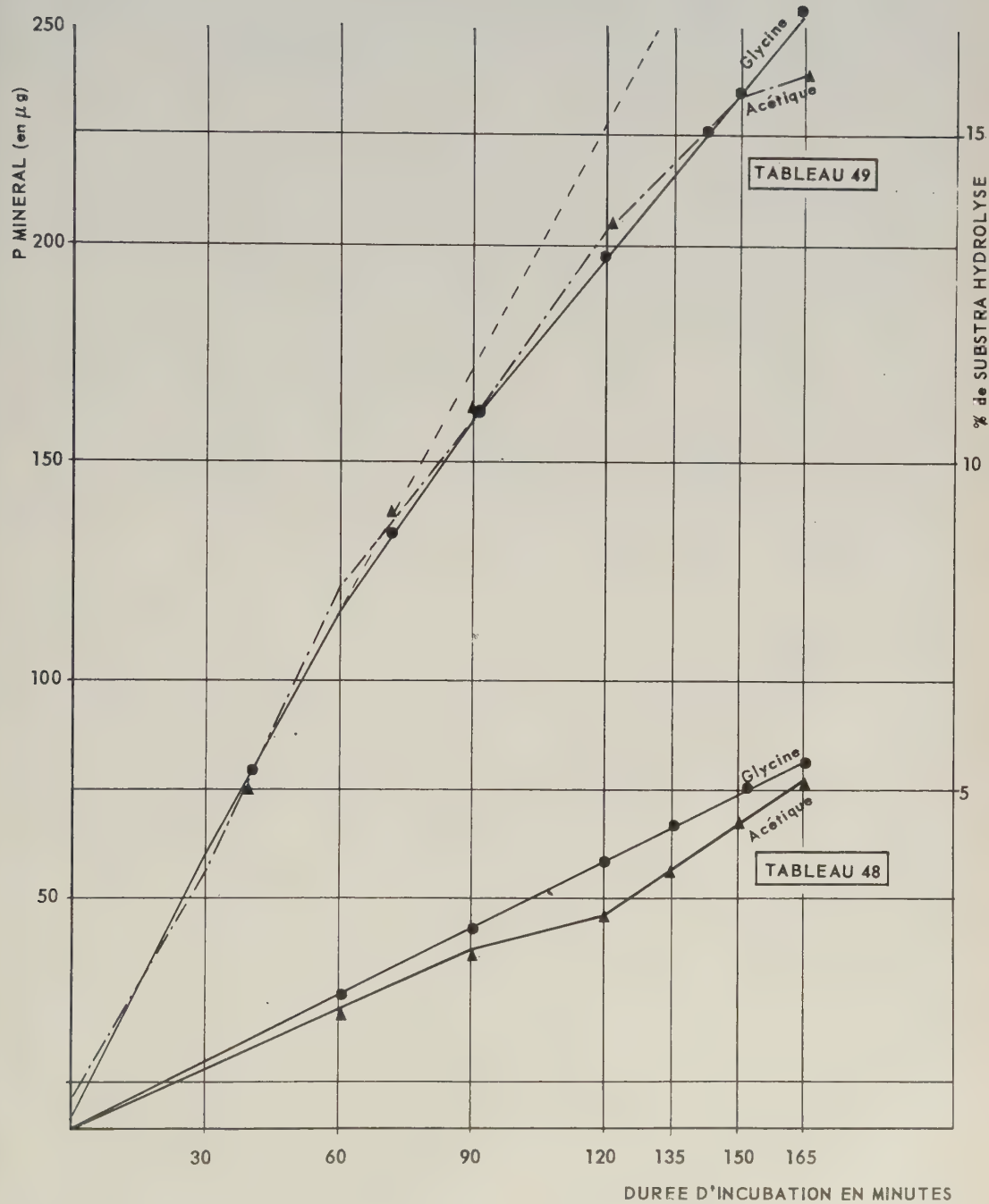
Matériel enzymatique : Suspension contenant 10×10^6 macrophages/ml. †

	Durée d'incubation en minutes	P min. (en µg) retrouvé dans la préparation		P min. (en µg) libéré par 1×10^6 cell.		% de substrat hydrolysé	
		(a)	(b)	(a)	(b)	(a)	(b)
1	30	57,50	59,50	5,75	5,95	3,85	3,97
2	60	121,00	116,00	12,10	11,60	8,05	7,75
3	90	159,00	160,00	15,90	16,00	10,60	10,65
4	120	202,00	197,00	20,20	19,70	13,45	13,10
5	135	218,30	220,00	21,80	22,00	14,50	14,65
6	150	234,00	234,00	23,40	23,40	15,60	15,60
7	165	238,00	251,00	23,80	25,10	15,90	16,75

Les résultats sont rapportés sur la figure n° 13. †

On peut y voir que, si la quantité de substrat hydrolysé atteint 10 % du total, l'activité de la PME acide se trouve inhibée par le P minéral libéré. †

FIGURE 13



2 - ETUDE DE L'ACTION DE DIVERS EFFECTEURS

Nous nous sommes adressés à quelques effecteurs classiques : le magnésium, le zinc et l'acide borique. Nous avons fait des déterminations en milieu acide et alcalin, l'objectif étant d'essayer de révéler une PME particulièrement sensible à l'un des effecteurs (nous pensions au Mg) ou ne devenant perceptible qu'en présence de celui-ci.

Les résultats sont inscrits dans le tableau n° 50.

TABLEAU N° 50

Tampons : 1 - Glycine à pH 4,75

2 - Acide acétique-acétate de Na à pH 4,75

3 - Véronal sodique à pH 9,85

4 - Glycine à pH 9,75

Substrat : Glycérophosphate de Na 0,025 M

Effecteur : 1 - Cl_2Mg $2,5 \times 10^{-3}$ M

2 - Acétate de Zn $2,5 \times 10^{-4}$ M

3 - Borate de Na $2,5 \times 10^{-3}$ M

Matériel enzymatique : Suspension contenant par ml. : 4×10^6 macrophages et $0,15 \times 10^6$ polynucléaires.

Tampons utilisés	P min. libéré (en μg) en 60 minutes par 1×10^6 macrophages, en présence de :			
	Néant	Mg	Zn	BO_3H
Acétique pH 4,75	27,50	28,00	28,00	27,50
Glycine pH 4,75	31,00	31,50	31,00	31,30
Véronal pH 9,85	0	0	0	0
Glycine pH 9,75	0	0	0	0

La lecture de ce tableau conduit aux conclusions suivantes :

1 - En milieu alcalin, quel que soit l'effecteur, aucune activité phosphomonoestérasique n'est perceptible.

2 - L'activité PME acide des macrophages n'est pas influencée par le Mg, le Zn et l'acide borique.

CONCLUSIONS

Deux grands types de cellules inflammatoires ont été successivement étudiés dans le cadre de ce travail consacré aux phosphomonoestérases (PME) des phagocytes : les polynucléaires et les macrophages.

Toutes ces cellules provenaient d'exsudats péritonéaux aseptiques provoqués chez le cobaye ; exsudats âgés de trois heures pour les polynucléaires, de quatre jours pour les macrophages.

La technique utilisée pour les dosages était inspirée de la méthode de O. BODANSKY pour les phosphomonoestérases alcalines sériques (10) et de celle de J. COURTOIS et M. PLUMEL pour les phosphomonoestérases acides sériques (21).

A LES POLYNUCLEAIRES INFLAMMATOIRES

1

Le premier travail, consacré par nous à ces cellules, intéresse les pH optimum de leurs activités phosphomonoestérasiques.

Les nombreux auteurs, qui, avant nous, se sont penchés sur le même problème ont rapporté, en général, des valeurs sensiblement différentes, que les polynucléaires proviennent du sang circulant ou d'exsudats péritonéaux inflammatoires. Cependant, toutes étaient situées dans des zones allant de 4 à 5,5 et de 9 à 10.

Notre premier but fut donc de déterminer, dans nos conditions opératoires, les pH optimum d'activités phosphomonoestérasiques. Ceci fut fait après avoir étudié l'emploi de diverses solutions tampon devant permettre des déterminations à des pH parfaitement stabilisés, sans introduire de puissants effecteurs de l'action enzymatique.

L'emploi de solutions tampon de deux types différents (solution à base de glycine ou à base de véronal pour les pH alcalins; à base de glycine ou à base d'acétates pour les pH acides) a permis de contrôler les déterminations. (

Les valeurs obtenues ont été de :

- pH 4,8 à pH 5,0
- et • pH 9,5 à pH 9,7.

Les mesures rapportées dans ce travail ont été faites en utilisant, comme substrat, du glycérophosphate de sodium du Codex, mélange en proportions variables des dérivés α et β , le même échantillon de ce sel ayant servi pour toutes les déterminations. (

L. (CHEVILLARD (19) avait indiqué deux pH optimum pour la PME alcaline des polynucléaires d'exsudats inflammatoires, selon le glycérophosphate utilisé, α ou β . Nous n'avons pas nous-même, retrouvé deux sommets d'activité maximum en utilisant ce mélange des dérivés α et β . (

2

La richesse des polynucléaires inflammatoires en PME acide ou alcaline varie nettement d'un animal à l'autre.

La nature et la qualité de l'alimentation n'influent pas sur les taux de PME de ces cellules : ce fait a été confirmé par une étude statistique intéressant des animaux nourris, pendant l'hiver, avec du fourrage sec, et, pendant l'été, avec une alimentation mixte de fourrage frais et de grains. (

3

Notre attention avait été attirée par le fait suivant : un exsudat, particulièrement pauvre en cellules, contenait des polynucléaires fort riches en PME acide et alcaline. Mademoiselle S. BAZIN nous avait dit, avoir constaté, à ce sujet, que les polynucléaires inflammatoires d'exsudats péritonéaux aseptiques étaient d'autant plus riches en glycogène que l'exsudat était plus pauvre en cellules. (

Une étude graphique comparant la richesse des exsudats en polynucléaires et les taux des PME acide et alcaline au sein de ces cellules a montré qu'aucune relation ne paraissait exister entre ces deux variables. (

4

L'activité de la PME alcaline des polynucléaires inflammatoires est renforcée par la présence, dans le milieu, de cations magnésium (du moins, tant qu'une certaine concentration en cet ion n'est pas

dépassée). Elle est inhibée par les anions phosphates et borates et le cation zinc. (Ces résultats confirment les travaux de D.M. CRAM et R.J. ROSSITER (25). La PME alcaline est aussi inhibée par les sulfamides.

A l'opposé, l'activité de la PME acide reste insensible aux cations magnésium et zinc et aux anions borates. Seuls, les phosphates parviennent à l'inhiber. (

Compte tenu de ces résultats, on a le droit de dire que les polynucléaires inflammatoires possèdent deux phosphomonoestérases distinctes. (

5

Pour un nombre donné de cellules, pour un temps d'incubation identique en présence de solution tampon ayant la même concentration en glycine, l'activité de la PME alcaline leucocytaire est sensiblement deux fois plus forte que l'activité de la PME acide.

6

Nombre d'auteurs ont trouvé de fortes activités de la PME alcaline au sein des collections purulentes ou des tissus enflammés (34, 124, 160, 117, 75), étude faite chez l'homme ou le cobaye. La présence des polynucléaires neutrophiles, la forte activité PME alcaline, dans le sang circulant de malades atteints de polynucléoses est, par ailleurs, un phénomène largement reconnu (67, 5, 4, 115, 125, 119, 117, 118, 83, 68, 72, 67). R.M.H. Mac MINN et F.R. JOHNSON ont cependant cru pouvoir affirmer que la PME alcaline n'était pas très active au niveau de blessures récentes provoquées sur l'intestin du chat, que le granulome entourant ces lésions, en voie de développement ou parvenu à maturité, ne paraissait pas receler de cellules riches en PME alcaline (72). Par là, les auteurs en question ont été conduits à admettre l'existence de facteurs locaux inconnus qui influenceraient l'activité enzymatique. Ils ne croyaient pas, en effet, à la possibilité de différences fondamentales dans les processus inflammatoires et fibrogénétiques locaux, suivant l'espèce animale envisagée, ou, pour une même espèce, suivant la nature du tissu lésé (72). (

Il nous paraît intéressant de rapprocher ces travaux de nos essais qui concernent la recherche d'une action possible des extraits leucocytaires et des extraits d'un organe tel que la rate. (

Existe-t-il au sein des cellules inflammatoires recueillies dans un exsudat aseptique des facteurs capables d'activer les PME des polynucléaires ? Nos expériences ont montré, après discussion de la méthode employée (voir page 68 et suivantes), que l'on pouvait envisager l'existence d'un métabolite qui passe à travers les parois cellulaires et exalte la PME alcaline des leucocytes (et, à un moindre degré, la PME acide). La lyse des cellules inflammatoires, au sein des collections purulentes,

peut donc libérer des effecteurs biologiques exaltant les PME des cellules inflammatoires apparaissant au sein de la lésion. (

De même, le broyat d'un organe, tel que la rate, contient un métabolite activateur des PME acide et, surtout, alcaline des polynucléaires inflammatoires. (

7

J.F. (DANIELLI et coll.) (28) ont étudié les richesses en PME alcaline des granulomes inflammatoires provoqués chez des animaux sains et scorbutiques. (Ils ont constaté que l'activité PME alcaline globale de ces lésions est moins élevée chez les animaux en avitaminose C. (Or le granulome correspond à un stade de réparation où les polynucléaires ont déjà disparu de la lésion et cédé la place à de multiples cellules, entre autre, les fibroblastes que de nombreux auteurs s'accordent à reconnaître riches en PME alcaline, lorsque les processus de formation du collagène sont en activité. (

Un autre problème nous a donc semblé intéressant à aborder : les polynucléaires inflammatoires qui, très vite, apparaissent au niveau des lésions récentes, seraient-ils aussi riches en PME alcaline s'ils provenaient d'animaux sains ou scorbutiques ?

Une double étude statistique a été entreprise. (Tout d'abord, en comparant deux groupes de cobayes, l'un formé d'animaux normaux, l'autre scorbutiques. (Puis les déterminations ont été faites à nouveau avec deux groupes d'animaux composés par le partage égal de portées de cobayes, élevés ensuite séparément et soumis aux alimentations nécessaires.

Nous avons ainsi constaté l'absence d'influence de l'avitaminose C sur les richesses en PME alcaline et acide des polynucléaires inflammatoires.

8

L'influence de la phagocytose sur les processus métaboliques des phagocytes est un fait généralement admis. (Il nous a semblé intéressant de rechercher si les activités PME alcaline et acide des polynucléaires inflammatoires varient lors de la phagocytose des germes microbiens. (

Nos expériences ont montré que la phagocytose n'influe pas sur la richesse des polynucléaires inflammatoires en PME acide ou alcaline. (

9

Après avoir constaté ces faits d'expérience, notre attention fut retenue par la publication, postérieure à nos essais, des travaux de

H.J. (BECKER et coll.) (5). Ces auteurs concluaient à l'augmentation de l'activité PME alcaline intraleucocytaire lorsqu'on faisait phagocyter des germes microbiens par des polynucléaires du sang circulant.

La différence fondamentale entre les deux types d'expériences, celles de H.J. (BECKER et coll.) et les nôtres rapportées au 8^e, réside dans la nature des cellules utilisées. Dans un cas il s'agit de polynucléaires du sang circulant, dans l'autre, le nôtre, de polynucléaires inflammatoires.

Aussi, avons-nous recommencé nos expériences avec des polynucléaires isolés du sang de cheval.

Les résultats de ces essais confirment les travaux de H.J. (BECKER et coll.) en concluant à une augmentation de l'activité PME alcaline des polynucléaires du sang circulant lors de la phagocytose.

La même expérience, réalisée pour la PME acide, conduit aux mêmes conclusions : élévation de l'activité PME acide lors de la phagocytose.

Rapprochant ces résultats, on peut donc, semble-t-il, émettre la conclusion suivante : l'augmentation de la richesse en ces deux phosphomonoestérases ne serait pas tant la conséquence de l'acte phagocytaire proprement dit que la traduction de modifications métaboliques survenues dans la cellule au moment où elle est apte à phagocyter.

10

L'augmentation de la richesse en PME des polynucléaires au sein d'une lésion inflammatoire, même aseptique, correspondrait donc à un état de grande activité fonctionnelle, la cellule devenant un phagocyte en puissance.

Cette activité fonctionnelle intense semble se traduire, en réalité, par un processus de maturation, et, secondairement, de dégénérescence accélérée. En effet, les cellules jeunes normales de la série myéloïde ne présentent pas de PME alcaline notable, mais leur maturation entraîne un enrichissement progressif en ces enzymes. Les essais rapportés au 6^e montrent que des polynucléaires inflammatoires broyés libèrent des activateurs des PME acide et alcaline des polynucléaires fraîchement isolés des exsudats.

Il n'est donc pas interdit de penser que l'activité fonctionnelle se traduit par l'apparition de catabolites activateurs des activités PME cellulaires.

On peut, de même, envisager l'apparition, au sein de certains tissus, de métabolites particuliers influençant les PME lorsque ces tissus sont lésés par une inflammation ou altération mécanique (voir, ci-dessus, l'influence d'un brayat de rate). Même conclusion, lorsque les organes hématopoïétiques sont soumis à une activité renforcée (cas des polynucléoses) ou désordonnée (leucémies, métaplasies),

ce qui expliquerait l'existence d'activités notables de la PME alcaline même au sein des cellules atypiques de la série lymphoïde (68, 77) ou des leucoses (77), alors que les cellules normales de la même série ne présentent pas de PME alcaline (44, 124, 121, 122, 60).¹

L'augmentation de la richesse en PME serait donc un signe de maturation puis de dégénérescence, ce qui serait en accord avec les travaux de E. HENRICKSEN (53) faits sur des cultures de tissu cardiaque d'embryon de poulet. Cette richesse serait influencée par des facteurs intracellulaires apparaissant normalement ou plus rapidement sous l'influence d'une grande activité fonctionnelle (état de phagocytose potentielle) ou des facteurs, extracellulaires, tissulaires ou lésionnels.

B LES MACROPHAGES

1

Les travaux consacrés à la détermination des pH optimum d'action des PME, nous ont conduit à constater l'existence d'activités phosphomonoestérases en milieu acide seulement. Deux pics d'activité très proches peuvent être envisagés : pH 5,1 et pH 5,8.¹

L'absence d'activité PME alcaline a été alors longuement discutée, afin d'éliminer toute intervention d'un facteur technique inhibant ou dissimulant une PME alcaline. Tous ces essais complémentaires ont confirmé l'absence de PME alcaline au sein des macrophages.

2

L'activité PME acide des macrophages est insensible à l'action des cations magnésium et zinc et des anions borates. Mais le pouvoir inhibiteur des phosphates a été retrouvé.¹

3

L'absence de PME alcaline au sein des macrophages confirme aussi les travaux de E. HENRICKSEN (53) déjà cités : l'examen du tissu cardiaque embryonnaire de poulet mis en culture ne montre pas de PME alcaline au niveau des fibroblastes dans les cultures jeunes. Les macrophages ont, rappelons-le, pour origine, entre autres cellules, des fibroblastes. Les deux résultats se recoupent donc.



B I B L I O G R A P H I E

- 1) BALDRIGUE (C.W.); GERARD (R.W.). The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* 1932, **103**, 235.
- 2) BARKA (T); SZALAY (S); POSALATY (Z); KERTEZ (L). Quantitative histochemical détermination of phosphatases by means of radioactive lead.
Acta Anatomica. 1952; **16**, 45
- 3) BAZIN (S); DELAUNAY (A); AVICE (C). Le glycogène intraleucocytaire et ses variations au cours de la phagocytose.
Ann. Inst. Past. 1953; **85**, 774.
- 4) BECK (WS); VALENTINE (WN). Biochemical studies on leucocytes: II) Phosphatases activity in chronic lymphatic leukemia, acute leukemia and miscellaneous hematologic conditions.
J. Lab. and Clin. Med. 1951, **38**, 245.
- 5) BECKER (H.J.); MUNDER (G); FISCHER (H). Über den Leukocytenstoffwechsel bei der phagocytose.
Hoppe Seyler's Zeitschrift, 1958, **313**, 266.
- 6) BEHRENDT (H). Phosphatases in blood of man.
Am. J. Clin. Path. 1949, **19**, 167.
- 7) BERRY (J.L.); SPIESS (T.D.). Phagocytosis.
Medicine. 1949, **28**, 239.
- 8) BESSIS (M). Etude sur l'ultracentrifugation des leucocytes.
C.R.Soc.Biol. 1950 **144**, 44.
- 9) BESSIS (M). Etude au microscope électronique des leucocytes ultracentrifugés
C.R.Acad.Sciences. 1955, **17**, 1723.
- 10) BODANSKY (O). Détermination de l'activité phosphatasique du sang.
J. Biol. Chem. 1932, **99**, 197.
- 11) BODANSKY (O). Mechanism of inhibition of phosphatase activity by glycine.
J.Biol.Chem. 1946, **165**, 605.
- 12) BOURNE (G). The distribution of alkaline phosphatase in various tissues.
Quart.J.Exp.Physiol. 1943, **32**, 1.
- 13) BUCKLEY (E.S.); POWELL (M.J.); GIBSON (J.G.). The separation of the formed elements of whole blood by means of fraction I.
J.Lab. and Clin. Med. 1950; **36**; 29.
- 14) BURGOS (M.H.) Histochemical and Chemical evidence for more than one alkaline phosphomondostérase.
J. Histochem. and Cytochem. 1955, **3**, 103.

- 15) BURTON (J.F.). Histochemical demonstration of acid phosphatase by an improved azo-dye method.
J. Histochem. and Cytochem. 1954, **2**, 88.
- 16) BUTLER (A.M.); CUSHMAN (M). Distribution of ascorbic acid in blood and its nutritional significance.
J. Clin. Invest. 1940, **19**, 459.
- 17) CASTIGLIONI (G.C); MACCHITELLA (E). Histochemical renal changes in burns.
Excerpta Med. 1954, **7**, 454.
- 18) CESARO (A.N); GRANATA (A). Acid and alkaline phosphatases in leukocytes of human peripheral blood. Experimental contribution to the intra-cellular localization of enzyme and quantitation.
Acta Histochem. 1956, **2**, 208.
- 19) CHEVILLARD (L). Sur les PME dans les moëllles de fémur, dans les ganglions lymphatiques, dans les leucocytes d'exsudat chez le cobaye et dans les plaquettes sanguines chez le lapin.
C.R.Soc. Biol. 1945, **139**, 249.
- 20) CHEVREMONT (M). Le système histiocytaire.
Biol. Rev. 1948, **23**, 267.
- 21) COURTOIS (J); PLUMEL (M). Détermination de l'activité phosphatase du sérum (phosphatase acide II).
Ann. de Biol. Clin. 1943, **1**, 251.
- 22) COURTOIS (J); BIGET (P). La phosphatase urinaire.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1943, **25**, 103.
- 23) COURTOIS (J). Hydrolyse comparée des acides α et β glycérophosphoriques par diverses phosphatases végétales. III) Action des arsénates et des fluorures sur la takadiastase.
Bull. Soc. Chim. Biol. 1937, **19**, 303.
- 24) COURTOIS (J); ROCHE (J). Les phosphatases
Exposés annuels de Biol. med. 1944, **4**, 219.
- 25) CRAM (D.M); ROSSITER (R.J.)
Phosphatases of rabbit polymorphonuclear leucocytes.
Canadian J. Res. 1940, **5** 290.
- 26) DALGAARD (J.B); AARHUS (V). Phosphatase in dogs following bile obstruction and removal of the small intestine.
Acta Physiol. Scand. 1949, **16**, 287.
- 27) DALGAARD (J.B). Preservation of phenylphosphatase activity during paraffine embedding.
J. Histochem. and Cytochem. 1956, **4**, 14.
- 28) DANIELLI (J.F); FELL (H.B); KODICEK (E). The enzymes of healing wounds: II) The effect of different degrees of vitamin-C deficiency on the phosphatase activity in experimental wounds in the guinea - pig.
Brit. J. Exp. Path. 1945, **26**, 367.

- 29) DANIELLI (J.F). A critical study of techniques for determining the cytological position of alkaline phosphatases.
J. Exper. Biol. 1946, **22**, 110.
- 30) DEANE (H.W); DEMPSEY (E.W).
The localization of phosphatases in the Golgi region of intestinal and other epithelial cells.
Anat. Rec. 1945, **93**, 401.
- 31) DEMPSEY (E.W); WISLOCKI (G.B). Histochemical contributions to physiology Physiol. Rev. 1946, **26**, 1.
- 32) DUNCAN CHIQUOINE (A). Further studies on the histochemistry of glucose-6-phosphatase.
J. Histochem. and Cytochem. 1955, **6**, 471.
- 33) FELL (H.B); DANIELLI (J.F). The enzymes of healing wounds. I-Distribution of alkaline PME in wounds and burns in the rat.
Brit. J. Exp. Path. 1943, **24**, 196.
- 34) ERANKO (O). Histochemical evidence of intense activity of phosphatase in the hypothalamic magnocellular nucleic of the rat.
Acta Physiol. Scand. 1952, **24**, 1.
- 35) FIESSINGER (N); BOYER (F). Les phosphatases des leucocytes.
Enzymologia. 1936, **1**, 172.
- 36) FLEMING (A). A simple method of removing leukocytes from blood.
Brit. Journ. of Exp. Path. 1926, **7**, 281.
- 37) FOLLETTE (J.H); VALENTINE (W.N); REYNOLDS (J). A comparison of human leukocyte phosphatase activity toward β glycérophosphate; adénosine 5 phosphate; and glucose 1 Phosphate.
Blood. 1959, **14**, 415.
- 38) FOLLEY (S.J); GREENBAUM (A.L). Effects of adrenalectomy and of treatment with adrenal cortex hormones on the arginase and phosphatase levels of lactating rats.
Biochem. J. 1946, **40**, 46.
- 39) FRENCH (J.E); BENDITT (A). Observations on the localization of alkaline phosphatase in healing wounds.
Arch. Path. 1954, **57**, 352.
- 40) GLICK (D); FISCHER (E.E). The histochemical localization of adenosine triphosphatase in plant and animal tissues.
Science. 1945, **102**, 429.
- 41) GLICK (D) FISCHER (E.E.). The histochemical localization of adenosine triphosphatase.
Science. 1946, **103**, 599.
- 42) GOMORI (G). Microchemical demonstration of phosphatase in tissue sections.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1939, **42**, 23.
- 43) GOMORI (G). Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions.
Arch. Path. 1941, **32**, 189.

- 44) GOMORI (G) The distribution of phosphatase in normal organs and tissues.
J. of cell. and comparative Physiol. 1941, **17**, 71.
- 45) GOMORI (G). Hexose diphosphatase.
J. Biol. Chem. 1943, **148**, 139.
- 46) GOMORI (G). Comparison of histochemical methods for acid phosphatase.
J. Histochem. and Cytochem. 1956, **4**, 425.
- 47) GREEN (M.H); VERNEY (E.L) A simple method for the study of intracellular acid phosphatase in hela cells.
J. Histochem. and Cytochem. 1956, **4**, 106.
- 48) GREENSTEIN (J.P). Distribution of acid and alkaline phosphatase in tumors, normal tissues and the tissues of tumor-bearing rats and mice.
J. Nat Cancer Institut. 1942, **2**, 511.
- 49) GROGG (E); PEARSE (A.G.E). A critical study of the histochemical technique for acide phosphatase, with a description of an azo-dye method.
J.Path. Bact. 1952, **64**, 627.
- 50) de HAAN (J). L'influence des sels de Ca sur le processus de la phagocytose.
Arch. Neerl. de Physiol. 1918, **2**, 674.
- 51) HAIGHT (W.J); ROSSITER (R.J). Data for the lymphocyte and the polymorphonuclear leucocytes on Man and rabbit.
Blood. 1950, **5**, 267.
- 52) HANCOX (N.M); NICHOLAS (E). A histochemical comparison of the hydrolysis rates of phenyl phosphate and glycérophosphate.
Acta Anatomica. 1956, **42**, 27.
- 53) HENRICHSSEN (E). Alkaline phosphatase in osteoblasts and fibroblasts cultivated in vitro.
Exp. Cell. Res. 1956, **11**, 115.
- 54) HOLT (S.J). Factors governing the validity of staining method for enzymes and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique.
Exp. cell. Res (supp). 1959, **1**.
- 55) HOVE (E); ELVEHYEN (C.A); HART (E.B). The effect of zinc on alkaline phosphatase.
J. Biol. Chem. 1940, **134**, 425.
- 56) IWATSURU (A); MINAMI (Y). Studien über phosphatase; die phosphatase im Blut, Milz, Leber und Nieren bei akuter lymphatischen Leukämie.
Biochem. Ztschr. 1934, **268**, 394.
- 57) IWATSURU (A) et coll. Über die Phosphatase, über die Phosphatasewirkung des Blutes sowie des Serums bei klinischer und experimenteller Eosinophilie.
Bioch. Ztschr. 1939, **301**, 23.

- 58) IWATSURU (A); NANJO (K). Studien über Phosphatase; über die phosphatasen Aktivität des Blutes, Serums und Harns bei chronischer myeloischen Leukämie *Bioch. Ztschr.* 1939, **300**, 422.
- 59) KABAT (E.A); FURTH (J). A histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues. *Am. J. Path.* 1941, **17**, 303.
- 60) KAPLOW (L.S). An histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. *Blood.* 1955, **10**, 1023.
- 61) KAY (M.D) Plasma phosphatase in osteitis deformans and in other diseases of bone. *Brit. J. Path.* 1929, **10**, 253.
- 62) KERPPOLA (W). Observations on the phosphatase content of blood and bone marrow cells in normal and pathologic hemopoiesis. *Blood.* 1951, **6**, 454.
- 63) KING (E.J); HASLEWOOD (G.A.D); DELORY (G.E); BEALL (D). Microchemical method of blood analysis. *Lancet.* 1942, **1**, 207.
- 64) KOWLESSAR (O.D); PERT (J.H); HAEFFNER (L.S); SLEISENGER (M.H). Localization of 5-nucleotidase and non specific alkaline phosphatase by starch gelelectrophoresis. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1959, **100**, 191.
- 65) KRUGELIS (E.J). Cytochemical demonstration of phosphatase in chromosomes of mouse testes. *J. Cell. Comp. Phys.* 1942, **19**, 376.
- 66) LAGERSTEDT (S); STENRAM (U). Selective alkaline phosphatase activity within the epithelium of the small intestine and kidney in rat. *Acta Anatomica.* 1950, **10**, 348.
- 67) LEONARD (B.J); ISRAEL (M.C); WILKINSON (J.F). Alkaline phosphatase in the white cells in leukemia and leukemoid reaction. *Lancet.* 1958, **7015**, 289.
- 68) LEONARDI (P). Alkaline phosphatase in leukocytes of peripheral blood and of bone marrow in normal and pathological conditions. *Rev. Anat. Patol.e.oncol.* 1953, **7**, 303.
- 69) LISON (L). La recherche histochimique des phosphatases. Etude critique. *Bull. d'histol. appliquée à la physiologie.* 1948, **25**, 23.
- 70) LODJA (Z). Über die quantitative Bestimmung der alkalischen Phosphatase und Aliesterase in histologischen Schnitten mit einem modifizierten Azokupplungsverfahren. *Acta Histochem.* 1958, **5**, 236.
- 71) Mac COLLUM (E.V), HARDT (E.B). The oxydation of ammonium salts of hydroxyfatty acids with hydrogen peroxyde. *J. Biol. Chem* 1908, **4**, 497.

- 72) Mac MINN (R.M.H); JOHNSON (F.R). Observation on the nature of fibrogenesis in the cat.
Transpl. bull. 1958, **5**, 398.
- 73) MANHEIMER (L.H); SELIGMAN (A.M). Improvement in the method for the histochemical demonstration of alkaline phosphatase.
J.Nat.Cancer Inst. 1949, **9**, 181.
- 74) MARTELLA (E.) Cytochemical aspects of the alkaline phosphatase of human leukocytes in pregnancy.
Arch.Ostet. e Ginecol. 1952, **57**, 245.
- 75) MAUPIN (B). Technique de séparation des globules blancs. I) Considérations générales.
Revue d'hématologie. 1959, **14**, 250.
- 76) MAUPIN (B). Technique de séparation des globules blancs. II) Technique de séparation globale des leucocytes sanguins.
Revue d'hématologie. 1959, **14**, 355.
- 77) MEISLIN (A.G); LEE (S.L); WASSERMAN (L.R). Variation de la phosphatase alcaline leucocytaire dans les désordres hématopoiétiques.
Cancer 1959; **12**, 760.
- 78) MENTEN (M.L); JUNGE (J); GREEN (M.H). Distribution of alkaline phosphatase in kidney following the use of histochemical azo-dyetest.
J; Biol. Chem. 1944, **153**, 471.
- 79) MERKER (H). Die Bedeutung der alkalischen leukocytenphosphatase bei Reaktionen und Erkrankungen der myeloischen Systems.
Schw. Med. Woch. 1959, **89**, 1051.
- 80) MERKER (H); HEILMEYER (L). Die alkalische Phosphatase neutrophiler Leukoziten.
Deutsch. Med. Woch. 1960, **85**, 253.
- 81) MINOR (A.H); BURNETT (L). A method for obtaining living leukocytes from human peripheral blood by acceleration of erythrocyte sedimentation.
Blood. 1948, **3**, 799.
- 82) MITUS (W.J); MEDNICOFF (I.B); DAMESHEK (W). Alkaline phosphatase of nature neutrophils in various polycythemiae.
New England J. Med. 1959, **250**, 1131.
- 83) MOLONEY (W.C). Leukocyte alkaline phosphatase activity in the rat.
Annals of the N.Y.Acad. of Sc. 1958, **75**, 31.
- 84) MOMIS (B); RUTEMBERG (A.M). Alkaline phosphatase in leukocytes by an azo-dye method.
Stain. Tech. 1959, **34**, 339.
- 85) MOOG (F). The physiological significance of the PME.
Biol. Rev. 1946, **21**, 41.

- 86) NUNZIANTE (C); GRANATA (A). Le fosfatasi acide ed alcaline nei leucociti del sangue periferico di soggetti umani normali. Contributo sperimentale ai fini della localizzazione endo cellulare degli enzimi e della loro evoluzione quantitativa.
Acta Histochem. 1955-56, 2, 208.
- 87) PLUM (C.M.). Phosphatase alcaline des cellules normales en pathologie de la moelle osseuse dans les éléments figurés du sang.
Acta Haematol. 1950, 4, 73.
- 88) POLLEY (J.R.). The microcolorimetric determination of inorganic phosphatase in plasma and urine.
Canadian J. of Res. "E". 1949, 27, 286.
- 89) RABINOVITCH (M); JUNQUEIRA (L.C.U.); MENDES (F.T.). Cytochemical documentation of "acid" phosphatase in bone marrow smears.
Science. 1948; 107, 322.
- 90) RABINOVITCH (M); ANDREUCCI (D). A histochemical study of acid and alkaline phosphatase distribution in normal bone marrow smears.
Blood. 1949, 4, 580.
- 91) ROBINEAUX (R); LEBRUN (J); KOURILSKY (R); DELAUNAY (A). Sur un nouveau procédé d'obtention des leucocytes à partir du sang circulant.
Ann. Inst. Past. 1949, 77, 1710.
- 92) ROCHE (J). Phosphatases sanguines.
Biochem. J. 1931, 25, 1724.
- 93) ROCHE J. Importance du substrat pour le pH optimum d'action des phosphatases sanguines (globules blancs, globules rouges, sérum).
Comptes rendus Soc. de Biol. 1931, 107, 640.
- 94) ROCHE (J); LAROMIGUIERE (S); LAURENS (A). Sur la différence des phosphatases alcalines (PME et pyrophosphatases) de divers organes animaux.
Comptes rendus Soc. de Biol. 1943, 137, 243.
- 94 ROCHE (J); NGUYEN VAN-THOAI. Phosphatase alcaline.
bis) Adv. Enzym. 1950; 10, 83.
- 95) ROSSITER (R.J.). Surface-active substances and the liberation of enzymes from rabbit polymorphonuclear leukocytes.
J. Physiol. 1949, 110, 136.
- 96) RUTEMBERG (A.M.); SELIGMAN (A.M.). New method for the histochemical demonstration of acid phosphatase.
J. Histochem. and Cytochem. 1954, 2, 445.
- 97) RUTEMBERG (A.M.). The histochemical demonstration of acid phosphatase by a post incubation coupling technique.
J. Histochem. and Cytochem. 1955, 3, 455.

- 98) SCHAJOWICZ (F); CABRINI (L). (Histochemical demonstration of acid phosphatase in hard tissues.
Stain Techn. 1959, 34, 59.
- 99) SELIGMAN (A.M.); HEYMANN (H); BARNETT (R.J.). (The histochemical demonstration of alkaline phosphatase activity with indoxyl phosphate.
J. Histochem. and Cytochem. 1954, 2, 441.
- 100) SINGER (T.P.); SILBERBACH (I); SCHWARTZ (S). (The preparation of morphologically intact leukocytes from peripheral blood by means of gramicidin and lysolecithin.
Blood (special issue). 1947, 1.
- 101) SPEAR (F). (Separation of leukocytes from whole blood by flotation on gum accacia.
Blood. 1948, 3, 1055.
- 102) STAHELIN (H); SUTER (E); KARNOUSKY (M.L.). (Studies on the interaction between phagocytes and tubercle bacilli.
J. Exp. Med. 1956, 104, 121.
- 103) SUZUKI (V); YOSHIMURA (K); TAKAISHI (M).
Tokio imp. Univ. Coll. agric. bulls. 1937, 7, 503.
- 104) TAFT (E.B.); SCOTT (J.F.). (Quantitative alkaline and acid phosphatases activities in fresh frozen and fixed tissue sections.
J. Histochem. and Cytochem. 1954, 2, 443.
- 105) TAFT (E.B.); SCOTT (J.F.). (Quantitative histochemical estimation of activities of alkaline and acid phosphomonoesterases.
J. Histochem. and Cytochem. 1958, 6, 340.
- 106) TAFT (E.B.); SCOTT (J.F.). (Effect of fixation and paraffin embedding on the activity of alkaline and acid PME.
J. Exp. Methods and Path. 1958, 7, 505.
- 107) TAKEUCHI (T); HIGASHI (K); EATANUKI (S). (Distribution of amylophosphorylase in various tissues of human and mammalian organs.
J. Histochem. and Cytochem. 1955, 3, 485.
- 108) TAKEUCHI (T); KURIAKI (H). (Histochemical detection of phosphorylase in animal tissues.
J. Histochem. and Cytochem. 1955, 3, 153.
- 109) TRUBOWITZ (S); FELDMAN (D); BENANTE (C); HUNT (V.N.). (The alkaline phosphatase content of the human polymorphonuclear leukocyte in blood and marrow.
Am. J. Clin. Path. 1959, 31, 483.
- 110) UMENO (M). (Studien über Phosphatase, über die glycerophosphatase der Leukocyten im Blute.
Bioch. Ztschr. 1931, 231, 328.

- 111) UTSUNOMIYA (S); YOSHIMURA (K). Change of alkaline phosphatase activities of leukocytes during bone fractures.
Igaku to Seibutsugaku (Med & Biol) 1952, 25, 302.
- 112) VACCARI (F); SABOTTO (B); MANZINI (E). Alkaline phosphatase activity of leukocytes in shock.
Blood. 1955, 10, 730.
- 113) VALEE (B.L.); HUGHES (W.L.); GIBSON (J.G.). The preparation of morphologically intact leukocytes from peripheral blood by means of gramicidin and lysolecithin.
Blood special issue. 1947, 1, 82.
- 114) VALENTINE (W.N.). Quantitative biochemical studies on leukocytes in Man: a review.
Blood. 1951, 6, 845.
- 115) VALENTINE (W.N.); BECK (W.S.). Biochemical studies on leukocytes: 4- Phosphatase activity in health, leukocytes and myelocytic leukemia.
J. Lab. Clin. Med. 1951, 38, 39.
- 116) VALENTINE (W.N.); FOLLETTE (J.H.); BARTON HARDIN (E); BECK (W.S.); LAWRENCE (J.S.). Studies on leukocytes alkaline phosphatase activity; relation to stress and pituitary adrenal activity.
J. Lab. Clin. Med. 1954, 44, 219.
- 117) VALENTINE (W.N.); FOLLETTE (J.H.); HARDIN (B.E.); BECK (W.S.). The relationship of leukocytes alkaline phosphatase to pituitary adrenal activity.
J. Clin. Invest. 1954, 33, 969.
- 118) VALENTINE (W.N.); FOLLETTE (J.H.); HARDIN (E.B.); BECK (W.S.); LAWRENCE (J.S.). Studies on leukocytes phosphatase activity: relation to "stress" and pituitary adrenal activity.
J. Lab. Clin. Med. 1954, 44, 219.
- 119) VALENTINE (W.N.). The enzymes of leukocytes.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 1955, 59, 1003.
- 120) VALENTINE (W.N.); TANAKA (K.R.); FREDRICKS (R.E.). Studies on leukocyte alkaline phosphatase: role of zinc and Magnesium.
J. Lab. Clin. Med. 1960, 55, 303.
- 121) VERCAUTEREN (R.). The intracellular distribution of alkaline and acid phosphatase in leukocytes.
Die Naturwissenschaften. 1954, 22, 532.
- 122) VERNE (J). L'activité phosphatasique alcaline des granulocytes neutrophiles. Etude histochimique chez le rat blanc.
Comptes rendus Soc. Biol. 1955, 149, 803.
- 123) VERNE (J); WEGMANN (R). Les phosphatases alcalines. Problème histochimique de leur localisation et de leur signification.
Path. Biol. 1959, 7, 1711.

- 124) WACHSTEIN (M). (Alkaline phosphatase activity in blood and bone marrow cells.
J. Lab. Clin. Med. 1946, 31, 1.
- 125) WACHSTEIN (M). (The distribution of histochemically demonstrable glycogen in human blood and bone marrow cells.
Blood. 1949, 4, 54.
- 126) WACHSTEIN (M); MEISEL (E). (Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH.
Am. J. Clin. Path. 1957, 11, 13.
- 127) WAGNER (R); YOURKE (A). (Alkaline and acid phosphatases in white blood cells and blood platelets.
Arch. Biochem. and Biophys. 1955, 64, 174.
- 128) WILLIAMS (M.J.); MENDEL (J.L.). Polycythemia vera terminating with myeloblastic leukemia. (Correlation of morphological findings with leukocytic phosphatase studies.
Blood. 1954, 9, 189.
- 129) WILTSHAW (E); MOLENEY (W.C.). Factors influencing leukocyte alkaline phosphatase activity.
J. Lab. Clin. Med. 1956, 47, 691.
- 130) WRIGHT (A). (voir Maupin 75, 76).
- 131) ZAZRZEWSKI (K); NALEC (J); BALASIEWICZ (W). Biochemistry of leukocytes : "Survival" in vitro", phosphorus metabolism and phagocytosis.
Radioisotopes Sci. Res. 1958, 3, 261.
- 132) ZORZOLI (A); STOWELL (E). Comparaison of the distribution of an hexose di-phosphatase with glycerophosphatase in different tissues.
Anat. Rec. 1947, 97, 495.



